

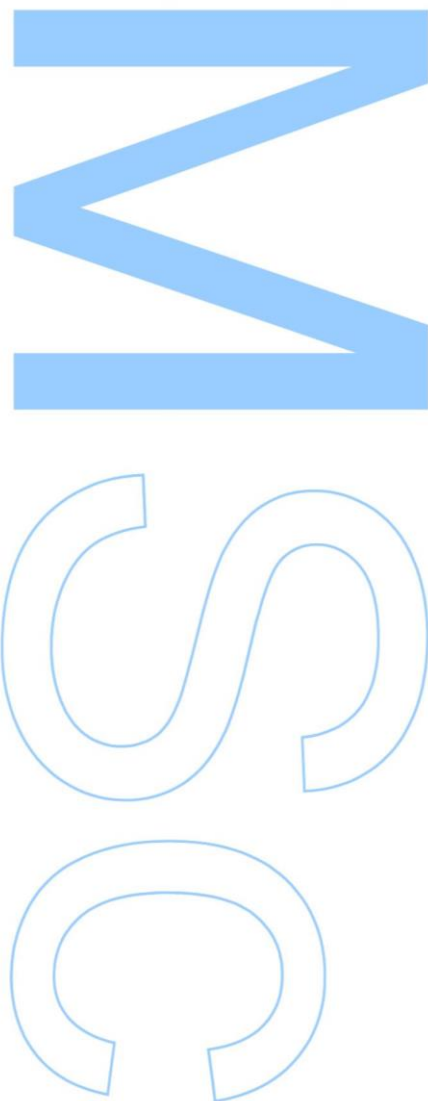
# Propriedades interfaciais e de auto-agregação de tensioativos derivados de treonina e suas misturas cataniónicas

Cristiana Isabel Coelho dos Santos

Mestrado em Química  
Departamento de Química  
2013

## Orientador

Prof. Doutor Eduardo Marques, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

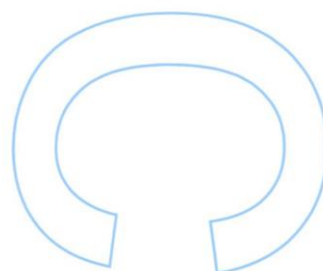
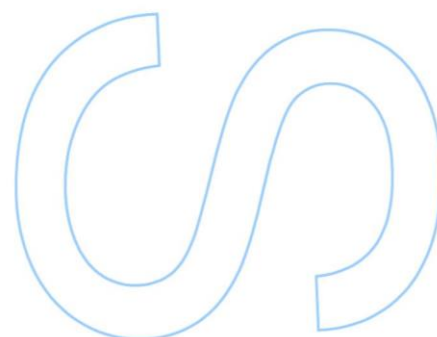
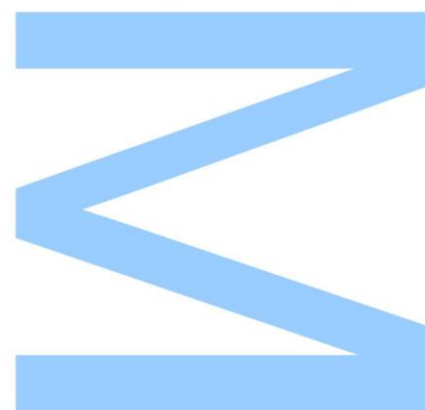




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



À minha família

# Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Doutor Eduardo Marques por todo o apoio, paciência, disponibilidade e ensinamentos em todo o processo de orientação deste mestrado, que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação científica e académica.

Aos meus colegas da linha 5 do Centro de Investigação em Química (Energética, colóides e bio-interfaces), agradeço todo o companheirismo.

Ao Ricardo, à Sandra e à Isabel quero agradecer a ajuda prestada durante o desenvolvimento da tese.

Agradeço ao João Martins, Paulo Morais, Tânia Dias e especialmente à Elisabete Silva pela vossa amizade e por me acompanharem e apoiarem em todos os momentos. Aos restantes amigos agradeço o fato de estarem sempre presentes na minha vida e me darem força para continuar.

À minha família o meu grande agradecimento pelo seu incentivo, apoio, compreensão e sacrifícios suportados durante todo este percurso.

## Resumo

O consumo em larga escala, a nível mundial, de tensioativos convencionais em aplicações domésticas, técnicas e industriais tem suscitado preocupações ambientais, já que esta classe de compostos químicos é frequentemente resistente à degradação ambiental. Deste modo, a necessidade de síntese e desenvolvimento de novas moléculas anfífilas biocompatíveis e biodegradáveis, como alternativa às atualmente existentes, assume particular importância. Para terem viabilidade prática, os novos tensioativos deverão demonstrar baixos níveis de toxicidade biológica e rápida biodegradação no meio ambiente, bem como um elevado desempenho interfacial.

Os tensioativos derivados de aminoácidos são constituídos por um resíduo de aminoácido na região polar da molécula, combinando cadeias alifáticas de número e comprimento variáveis na região apolar. Dada a sua estrutura molecular baseada em fontes naturais, biocompatibilidade melhorada, baixa ecotoxicidade e citotoxicidade humana tipicamente moderada ou baixa, esta classe de tensioativos representa uma alternativa viável e promissora à dos tensioativos convencionais de origem petroquímica. Atualmente, os tensioativos derivados de aminoácidos são aplicados comercialmente para diversos fins, na área dos cosméticos e aditivos alimentares, como agentes redutores na inibição da corrosão, e na área farmacêutica e biomédica em formulações para terapia genética não viral e entrega controlada de fármacos.

Neste trabalho, pretendeu-se, como primeiro objetivo, investigar as propriedades físico-químicas de uma família de novos tensioativos aniónicos, de estrutura monomérica e cadeia alquílica simples de comprimento crescente, derivados do aminoácido treonina. Os compostos são designados por  $\text{NanThr}$ , em que  $n$  representa o número de átomos de C da cadeia hidrocarbonada. As propriedades interfaciais medidas— concentração micelar crítica, ( $\text{cmc}$ ), tensão superficial na  $\text{cmc}$ ,  $\gamma_{\text{cmc}}$ , excesso superficial máximo,  $\Gamma_{\text{max}}$ , e área molecular interfacial mínima,  $a_s$ — para cada tensioativo individual, foram estudadas por tensiometria, através do método da placa de Wilhelmy. Devido à presença de um grupo funcional carboxílico na cabeça polar dos compostos, cuja protonação é dependente do pH, realizaram-se estudos de micelização em função deste parâmetro experimental. Os resultados obtidos para o conjunto de propriedades interfaciais medidas foram comparados com os de moléculas anfífilas homólogas, referidas na literatura. Verifica-se que os derivados de treonina apresentam comparativamente melhor desempenho interfacial.

Posteriormente, pretendeu-se estudar o comportamento de fase e efetuar a caracterização microestrutural de várias misturas de tensioativos catiónicos/aniónicos (misturas *cataniónicas*), contendo como tensioativo aniónico comum o derivado Na12Thr previamente estudado. O principal objetivo desta parte do trabalho consistiu na procura de sistemas cataniónicos em que se verificasse a formação de lipossomas estáveis, de potencial interesse para aplicações na área da veiculação de biomoléculas. Os sistemas investigados envolveram, assim, misturas aquosas de Na12Thr com: (i) o tensioativo comercial brometo de dodeciltrimetilamónio, DTAB; (ii) um tensioativo derivado do amino ácido serina com cadeia alquílica de doze carbonos 12SerTFAc; (iii) geminis bis-quats de amónio quaternário, designados por 12-*n*-12, com diferente número de átomos de carbono no *n*, nomeadamente *n* = 2, 5 e 12 e; (iv) geminis bis-quats derivados de serina, designados por (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>, com espaçadores de 5 e 12 átomos de carbono, respetivamente. Utilizou-se a microscopia de luz com contraste de interferência diferencial para caracterização morfológica dos agregados presentes em solução.

Identificou-se, nas diferentes misturas cataniónicas, a presença de várias regiões fásicas, designadamente regiões monofásicas de solução e regiões de separação de fase (bifásicas), contendo diferentes tipos de estruturas auto-agregadas. Foi possível observar a formação de lipossomas, agregados tubulares, partículas sólidas (cristalitos) e soluções contendo micelas mistas. As misturas cataniónicas entre o composto Na12Thr e os diferentes geminis convencionais contendo estruturas lipossómicas foram ainda caracterizadas por microscopia eletrónica de varrimento criogénica (cryo-SEM) e dispersão dinâmica de luz (DLS, *dynamic light scattering*), de modo a obter-se uma informação mais detalhada sobre a sua estrutura fina, tamanho, potencial zeta e frequência populacional de tamanho dos agregados presentes em solução.

## Abstract

The worldwide consumption in large scale of surfactants in domestic, technical and industrial applications, has raised environmental concerns, since this class of chemical compounds is often resistant to environmental degradation. Thus, the need for synthesis and development of new biocompatible and biodegradable amphiphilic molecules, as an alternative to current conventional surfactants, has become pivotal. The novel surfactants should possess not only efficient interfacial properties, but also high levels of biocompatibility and biodegradability in the environment.

Amino acid-base based surfactants combine aliphatic chains of variable length and number with polar head groups containing one or more amino acid residues. Due to their simple molecular structure and origin from natural sources, enhanced biocompatibility, low ecotoxicity, and moderate-to-low human cytotoxicity, amino acid-based surfactants have emerged as a viable and promising alternative to surfactants derived from petrochemicals. Currently, amino acid-derived surfactants are commercially applied in a number of different areas, from cosmetics, non-viral gene therapy and drug delivery, to food additives and reducing agents for corrosion inhibition.

In this work as a first objective, the aim was to study the physicochemical properties of a family of new anionic surfactants with simple monomeric configuration and increasing alkyl chain length, derived from the amino acid Threonine. The compounds are designated by  $\text{NanThr}$ , where  $n$  is the number of C atoms in the hydrocarbon chain. The measured interfacial properties (critical micelle concentration,  $\text{cmc}$ , the surface tension at the  $\text{cmc}$ ,  $\gamma_{\text{cmc}}$ , maximum surface excess concentration,  $\Gamma_{\text{max}}$ , and minimum surface area per molecule,  $a_s$ ) for each individual surfactant, were studied by tensiometry, using the Wilhelmy plate method. Due the presence of a functional carboxylic group in the polar head of the compounds, wich protonation is pH dependent, micellization studies were carried out as a function of this experimental parameter. The obtained results for the group of measurement interfacial properties were compared with those of the homologous amphiphilic molecules, reported in the literature. The Threonine-based compounds show a comparatively better interfacial performance.

Subsequently, the goal was to study and perform the microstructural characterization of several cationic/anionic mixtures (catanionic mixtures) coating the Threonine-based surfactant previously studied as the common anionic surfactant. The main objective of this part of this work consisted in the search of catanionic systems in which stable liposomes formation was verified, of potential interest for application in the delivery of biomolecules. The studied systems involved aqueous mixtures of the

compound Na12Thr with the commercial surfactant dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB), the amino acid serine-based surfactant with alkyl chain of sixteen carbons, 12SerTFAC, the mixture of Na12Thr with conventional geminis with different spacer length, particularly with two, five and twelve carbons and at last the mixture of the compound Na12Thr with serine-based bis-quats gemini surfactants, (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> and (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>.

In order to characterize the structural properties of the aggregates formed in solution, to perform a comparative study of the formed aggregates, light polarized microscopy with differential interference contrast was used. In the different catanionic mixtures, the presence of several phasic regions, containing different type of aggregates, was identified. Thus, unilamellar and multilamellar vesicles, tubular aggregates, solid particles (crystallites) and solutions containing micelles could be observed. The catanionic mixtures between the compound Na12Thr and different conventional Gemini surfactant containing vesicular aggregates were further characterized by cryogenic scanning electron microscopy (*cryo*-SEM) in order to obtain a more detailed information on their fine structure. To complement the study of catanionic mixtures between Na12Thr and different Gemini surfactant, the diameter, zeta potential and population frequency of the generated aggregates were determined by dynamic light scattering.



# Índice Geral

<b>Agradecimentos</b>	<b>4</b>
<b>Resumo</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>Índice Geral</b>	<b>9</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>11</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>16</b>
<b>I Introdução</b>	<b>19</b>
1.1. Tensioativos	19
1.1.1. Estrutura e propriedades básicas dos tensioativos	19
1.1.2. Comportamento de fase e agregação	24
1.1.3. Tensioativos derivados de aminoácidos	31
1.2. Micelização	33
1.2.1. Concentração micelar crítica e estrutura micelar	33
1.2.2. Modelos termodinâmicos de micelização	36
1.2.3. Fatores influenciadores da <i>cmc</i>	39
1.2.4. Temperatura de Krafft	40
1.2.5. Tensão superficial	41
1.3. Lipossomas	46
1.3.1. Métodos de formação: lipossomas espontâneos versus não –espontâneos	48
1.3.2. Aplicações dos lipossomas	49
1.3.3. Lipossomas cataniónicos e âmbito do trabalho	50
<b>II Secção Experimental</b>	<b>52</b>
2.1. Compostos utilizados	52
2.2. Preparação das amostras	56
2.3. Tensiometria	57
2.3.1. Procedimento experimental	59
2.3.2. Análise de dados	61
2.4. Microscopia	61
2.4.1. Microscopia de luz	61
2.4.2. Microscopia de luz polarizada	62
2.4.3. Contraste por Interferência Diferencial	63
2.4.4. Procedimento experimental	64

2.4.5. Microscopia eletrónica	65
2.4.6. Microscopia eletrónica de varrimento criogénica (cryo–SEM)	66
2.4.7 Preparação de amostras	66
2.5. Dispersão dinâmica de luz	67
2.5.1. Procedimento experimental	68
<b>III Resultados e Discussão</b>	<b>69</b>
3.1. Propriedades interfaciais dos tensioativos derivados de treonina	69
3.1.1. Estudos sem pH ajustado	70
3.1.2. Estudos com pH ajustado	74
3.2. Análise comparativa dos parâmetros interfaciais obtidos: efeito do pH e do comprimento de cadeia hidrocarbonada	79
3.3. Comportamento de fase e microestrutural de misturas cataniónicas contendo o n-dodeciltreoninato de sódio (Na12Thr)	85
3.3.1. Mistura cataniónica com tensioativo monomérico comercial(DTAB)	86
3.3.2. Mistura cataniónica com tensioativo monomérico derivado de serina (12SerTFAc)	88
3.3.3. Mistura cataniónica com tensioativos gemini bis-quat 12-n-12	89
3.3.4. Misturas cataniónicas com tensioativos bis-quat derivados de serina (12Ser) <sub>2</sub> N <sub>5</sub> e (12Ser) <sub>2</sub> N <sub>12</sub>	102
3.4. Análise comparativa das misturas cataniónicas: efeito da estrutura molecular do tensioativo catiónico	103
<b>IV Conclusão</b>	<b>108</b>
4.1. Conclusões gerais	108
4.2. Trabalho futuro	109
<b>V Bibliografia</b>	<b>110</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Estrutura genérica e representação esquemática do comportamento de um tensioativo em solução (adsorção), para concentração inferior à <i>cmc</i> .....	19
<b>Figura 1.2</b> – Estruturas auto-organizadas formadas por moléculas de tensioativo.....	20
<b>Figura 1.3</b> – Exemplo de um tensioativo aniónico: dodecilssulfato de sódio (SDS)....	21
<b>Figura 1.4</b> – Exemplo de um tensioativo catiónico: brometo de dodeciltrimetilamónio (DTAB).....	21
<b>Figura 1.5</b> – Exemplo de um tensioativo não-iónico, um octilglucosídeo. ....	22
<b>Figura 1.6</b> – Exemplo de um tensioativo zwitteriónico: dimiristoílfosfatidilcolina (DMPC), um fosfolípido. ....	22
<b>Figura 1.7</b> – Exemplo de um tensioativo cataniónico: Hexadeciltrimetilamónio 4-octilbenzenosulfonato ( TABSo).....	23
<b>Figura 1.8</b> – a) Estrutura molecular do gemini n-2-m, com m =12, 14, 16 e 18. Retirado de <sup>9</sup> . b) Estrutura molecular do tensioativo bolaforme C <sub>6</sub> PhC <sub>6</sub> . Retirado de <sup>8</sup> .....	23
<b>Figura 1.9</b> – Representação de diferentes tipos de formas geométricas utilizadas no empacotamento de tensioativos. ....	26
<b>Figura 1.10</b> Representação dos raios principais de curvatura, R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> , que são mutuamente perpendiculares e têm sinais contrários. ....	27
<b>Figura 1.11</b> – Diagrama de Fontell: sequência lógica ideal de mesofases com a variação da concentração de tensioativo. Retirado de <sup>17</sup> .....	31
<b>Figura 1.12</b> – Diagrama de fase representativo para o tensioativo iónico DTAC. Retirado de <sup>18</sup> .....	31
<b>Figura 1.13</b> – Tensioativos derivados de aminoácidos: a) tensioativo de cadeia simles; b) tensioativo gemini; c) tensioativo com estrutura glicerolípida. Retirado de <sup>22</sup> .....	32
<b>Figura 1.14</b> – Representação esquemática da variação de algumas propriedades físicas de uma solução aquosa de tensioativo com a concentração.....	34
<b>Figura 1.15</b> – Esquema representativo da formação de micelas. ....	34
<b>Figura 1.16</b> – Exemplo esquemático de uma micela e uma micela invertida, respetivamente. ....	35
<b>Figura 1.17</b> - Fracção de surfactante que incorpora a micela, $d(N[SM])/d([S]T)$ , versus a concentração de surfactante total, $[S]T$ . Retirado de <sup>12</sup> .....	37
<b>Figura 1.18</b> – Representação esquemática de um diagrama de fase para um sistema binário tensioativo-água, destacando-se a temperatura de Krafft e a concentração micelar crítica.....	41
<b>Figura 1.19</b> – Moléculas e respetivas forças presentes num líquido. ....	42

.....	43
<b>Figura 1.20</b> – Armação metálica constituída por um arame dobrado em U com um segundo arame que desliza sobre o anterior como um êmbolo. ....	43
<b>Figura 1.21</b> – Adsorção em interfaces líquido-gás: modelo de Gibbs. ....	43
<b>Figura 1.22</b> – Representação esquemática de um corte de secção transversal de (A) – normal e (B) – lipossoma reverso, em solvente polar e solvente apolar. Adaptada de <sup>33</sup> .....	47
<b>Figura 1.2.3</b> – Processos mecânicos não-espontâneos que conduzem à formação de lipossomas. Retirado de <sup>40</sup> .....	49
<b>Figura 2.1</b> – Esquema de síntese dos tensioativos aniónicos derivados de Treonina.	52
<b>Figura 2.2</b> – Estruturas moleculares dos diferentes tensioativos derivados de treonina. ....	53
<b>Figura 2.3</b> – Estruturas moleculares dos diferentes tensioativos catiónicos. a) DTAB; b) 12SerTFAC; c), d) , e) geminis bis-quat12-n-12; f) e g) geminis bis-quat derivados de serina (12Ser) <sub>2</sub> N <sub>5</sub> e (12Ser) <sub>2</sub> N <sub>12</sub> .....	55
<b>Figura 2.4</b> – Diferentes métodos para obtenção da tensão superficial. ....	57
<b>Figura 2.5</b> - a) Placa de Wilhelmy utilizada no decorrer do trabalho; b) Processo de medição da tensão superficial através do método da placa de Wilhelmy. ....	59
<b>Figura 2.6</b> – Tensiómetro DCAT11. ....	59
<b>Figura 2.7</b> – Medição da tensão superficial pelo método da placa de Wilhelmy: 1) o vaso que contém a solução é elevado até entrar em contato com a parte inferior da placa; 2) a placa é imersa cerca de 3 mm, formando-se um menisco em torno da mesma; 3) a balança mede o valor de massa do perímetro da placa, convertido em força; 4) depois da medição, o vaso desce à posição inicial .....	60
<b>Figura 2.8</b> – Gráfico representativo da variação da tensão superficial com o logaritmo da concentração de tensioativo. ....	61
<b>Figura 2.9</b> – Representação esquemática de um microscópio equipado com sistema de iluminação de contraste por interferência diferencial (DIC). ....	64
<b>Figura 2.10</b> – Microscópio ótico ligado ao controlador de temperatura da placa de Linkam. ....	65
<b>Figura 3.1</b> – Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na8Thr, $\theta = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	70
<b>Figura 3.2</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na10Thr, $\theta = 25.0^{\circ}\text{C}$ .....	71
<b>Figura 3.3</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na12Thr, $\theta = 25.0^{\circ}\text{C}$ .....	71

<b>Figura 3.4</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na14Thr, $\theta = 40.0^{\circ}\text{C}$ .....	72
<b>Figura 3.5</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na16Thr, $\theta = 60.0^{\circ}\text{C}$ .....	72
<b>Figura 3.6</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal para a série de compostos sem pH ajustado.....	73
<b>Figura 3.7</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na8Thr, $\theta = 25.0^{\circ}\text{C}$ e com pH=12.0.....	75
<b>Figura 3.8</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na10Thr, $\theta = 25.0^{\circ}\text{C}$ e com pH=12.0.....	76
<b>Figura 3.9</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na12Thr, $\theta = 25.0^{\circ}\text{C}$ e com pH=12.0.....	76
<b>Figura 3.10</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na14Thr, $\theta = 40.0^{\circ}\text{C}$ e com pH=12.0.....	77
<b>Figura 3.11</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na16Thr, $\theta = 60.0^{\circ}\text{C}$ e com pH=12.0.....	77
<b>Figura 3.12</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal para a série de compostos com pH ajustado.....	78
<b>Figura 3.13</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal para os compostos Na8Thr, Na10Thr, Na12Thr, sem e com pH ajustado, à temperatura de $25.0^{\circ}\text{C}$ .....	79
<b>Figura 3.14</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal para os compostos Na14Thr sem e com pH ajustado, à temperatura de $40.0^{\circ}\text{C}$ .....	80
<b>Figura 3.15</b> - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal para os compostos Na16Thr sem e com pH ajustado, à temperatura de $60.0^{\circ}\text{C}$ .....	81
<b>Figura 3.16</b> – Regressão linear do logaritmo neperiano da cmc com o número de carbonos da cadeia alquílica para todos os compostos. Comparação com os tensioativos aniônicos convencionais com o mesmo comprimento de cadeia. ....	82
<b>Figura 3.17</b> – Regressão linear do logaritmo neperiano da cmc com o número de carbonos da cadeia alquílica para os compostos Na8Thr, Na10Thr e Na12Thr. Comparação com os tensioativos aniônicos convencionais com o mesmo comprimento de cadeia. ....	82
<b>Figura 3.18</b> – Variação da tensão superficial na cmc com o número de carbonos da cadeia alquílica para os novos compostos. ....	83
<b>Figura 3.19</b> – Variação da área molecular mínima com o número de carbonos da cadeia alquílica para os novos compostos.....	84

<b>Figura 3.20</b> - a) Amostra estudada do sistema Na12Thr/(12Ser)2N5 ( $x^- = 0.80$ , solução turva); b) amostra estudada do sistema Na12Thr/(12Ser)2N5 ( $x^- = 0.90$ , solução límpida).....	86
<b>Figura 3.21</b> – Representação esquemática do comportamento fásico macroscópico apresentado pela mistura Na12Thr/DTAB à temperatura de 25.0°C.....	86
<b>Figura 3.22</b> – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/DTAB. Presença de lipossomas multivesiculares. Barra de escala = 20 $\mu\text{m}$ .....	87
<b>Figura 3.23</b> – Representação esquemática do comportamento fásico macroscópico apresentado pela mistura Na12Thr/12SerTFAc à temperatura de 25.0 °C.....	88
<b>Figura 3.24</b> – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12SerTFAc. Separação de fase (líquido-líquido). Barra de escala = 20 $\mu\text{m}$ .....	88
<b>Figura 3.25</b> – Representação esquemática do comportamento fásico macroscópico apresentado pelas misturas Na12Thr/12-n-12 à temperatura de 25.0°C. X- representa a fração molar de tensioativo aniónico na mistura dos tensioativos. ....	90
<b>Figura 3.26</b> – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12-2-12. Na amostra $x^- = 0.67$ (A2) e 0.70 (B2) observam-se lipossomas e agregados tubulares. Barras de escala de A <sub>2</sub> e B <sub>2</sub> = 20 $\mu\text{m}$ .....	91
<b>Figura 3.27</b> – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12-5-12.Em todas as frações molares foram observados lipossomas esféroides unilamelares. Barras de escala = 20 $\mu\text{m}$ e para a micrografia C <sub>3</sub> = 28 $\mu\text{m}$ . ....	92
<b>Figura 3.28</b> – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12-12-12. Na amostra $x^- = 0.67$ foi observada separação de fase ( líquido-líquido). Na amostra $x^- = 0.70$ observaram-se lipossomas esféroides unilamelares e agregados tubulares.. Barras de escala de L e M = 20 $\mu\text{m}$ .....	93
<b>Figura 3.29</b> – Distribuição de tamanho em função da intensidade para a fração $x^- = 0.67$ para Na12Thr/12-2-12 e Na12Thr/12-5-12 .....	94
<b>Figura 3.30</b> – Distribuição de tamanho em função da intensidade para a fração $x^- = 0.70$ para Na12Thr/12-2-12, Na12Thr/12-5-12 e Na12Thr/12-12-12.....	95
<b>Figura 3.31</b> – Comportamento em solução das misturas cataniónicas Na12Thr/12-2-12, Na12Thr/12-5-12 e Na12Thr/12-12-12.Todas as micrografias das misturas cataniónicas apresentam lipossomas esféroides unilamelares. Barra de escala de 1 e 2 $\mu\text{m}$ .....	98
<b>Figura 3.32</b> – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12-5-12 (A e B) a 30.0°C e ( C, D, E e F) a 35.0°C. Barras de escala de A, B, C e E = 20 $\mu\text{m}$ ; D e G = 10 $\mu\text{m}$ . Presença de lipossomas esféroides unilamelares e agregados tubulares	100
<b>Figura 3.33</b> – Representação esquemática do comportamento fásico macroscópico apresentados pelas misturas Na12Thr/(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>5</sub> e Na12Thr/(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>12</sub> à temperatura de 25.0°C.....	102

**Figura 3.34** – Comportamento em solução da mistura catiónica Na<sub>12</sub>Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e Na<sub>12</sub>Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>. A5 - vesículos esféricos unilamelares e B5 – solução micelar. Barras de escala = 20µm ..... 103

**Figura 3.35** – Representação esquemática do comportamento físico dos sistemas catiónicos estudados. A – Na<sub>12</sub>Thr/DTAB; B – Na<sub>12</sub>Thr/12SerTFAc; C – Na<sub>12</sub>Thr/12-2-12; D – Na<sub>12</sub>Thr/12-5-12 ; E – Na<sub>12</sub>Thr/12-12-12 ; F – Na<sub>12</sub>Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e G – Na<sub>12</sub>Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>. ..... 105

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Relação entre PCE, $c$ e as estruturas auto-organizadas.....	28
<b>Tabela 1.2</b> – Notações adotadas para as várias fases líquido-cristalinas.....	30
<b>Tabela 1.3</b> – Constantes de Klevens para vários tipos de tensioativos .....	39
<b>Tabela 1.4</b> – Classificação dos lipossomas de acordo com o seu raio e número de bicamadas .....	48
<b>Tabela 2.1</b> – Compostos estudados e respetiva massa molar .....	53
<b>Tabela 2.2</b> – Tensioativos catiónicos utilizados neste trabalho .....	54
<b>Tabela 2.3</b> – Formas de expressão de composição de amostras preparadas neste trabalho .....	56
<b>Tabela 3.1.</b> Parâmetros interfaciais para as soluções aquosas dos tensioativos aniónicos.....	73
<b>Tabela 3.2</b> – Valores de pH para as soluções-stock de tensioativo usadas .....	75
<b>Tabela 3.3.</b> Parâmetros interfaciais para as soluções aquosas dos tensioativos aniónicos.....	78
<b>Tabela 3.4</b> – Parâmetros interfaciais determinados para os tensioativos aniónicos....	79
<b>Tabela 3.5</b> – Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura catiónica Na12Thr/DTAB para $T = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	87
<b>Tabela 3.6</b> - Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura catiónica Na12Thr/12SerTFAC para $T = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	89
<b>Tabela 3.7</b> – Diâmetro hidrodinâmico médio ( $\pm$ SD), frequência populacional dos agregados para os respetivas frações catiónicas, e grau de dispersão a $T=25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	94
<b>Tabela 3.8</b> – Potencial zeta para as diferentes razões de mistura dos sistemas catiónicos.....	96
<b>Tabela 3.9</b> – Gama de tamanhos de lipossomas para as misturas catiónicas Na12Thr/12-n-12 .....	99
<b>Tabela 3.10</b> – Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura catiónica Na12Thr/12-n-12 para $T = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	101
<b>Tabela 3.11</b> - Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura catiónica Na12Thr/DTAB para $T = 30.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $35.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	101
<b>Tabela 3.12</b> - Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura catiónica Na12Thr/geminis bis-quats de serina para $T = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	103



## Abreviaturas e Símbolos

<b>Na8Thr</b>	N – octadecanoíl treoninato de sódio
<b>Na10Thr</b>	N – decanoíl treoninato de sódio
<b>Na12Thr</b>	N – dodecanoíl treoninato de sódio
<b>Na14Thr</b>	N – tetradecanoíl treoninato de sódio
<b>Na16Thr</b>	N – hexadecanoíl treoninato de sódio
<b>DTAB</b>	Brometo de dodeciltrimetilamónio
<b>DTAC</b>	Cloreto de dodeciltrimetilamónio
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub></b>	Pentametileno bis{(dodecil)[(2-hidroxi-1-metoxycarbonil)-etil(metil)amónio Bis(trifluoroacetato)]}
<b>(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub></b>	Dodecametileno bis{(dodecil)[(2-hidroxi-1-metoxycarbonil)-etil(metil)amónio Bis(trifluoroacetato)]}
<b>12SerTFAc</b>	N-dodecadecil-N-(2-hidroxil-1-metiloxycarbonil)etil-N-dimetilamónio trifluoroacetato
<b>12-2-12</b>	1,2-bis(dodecildimetilamónio)etano dibromo
<b>12-5-12</b>	1,2-bis(dodecildimetilamónio)pentano dibromo
<b>12-12-12</b>	1,2-bis(dodecildimetilamónio)dodecano dibromo
<b>PyBOP</b>	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfónio
<b>DIEA</b>	N,N-diisopropiletilamina
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>MeOH</b>	Metanol
<b><i>cryo-SEM</i></b>	Microscopia eletrónica de varrimento criogénica
<b>DLS</b>	Dispersão dinâmica de luz
<b>PLM</b>	Microscopia de luz polarizada
<b><i>cmc</i></b>	Concentração micelar crítica
<b><i>T<sub>Kr</sub></i></b>	Temperatura de Krafft
<b><i>T<sub>m</sub></i></b>	Temperatura de transição gel-cristal líquido
<b><i>a<sub>s</sub></i></b>	Área molecular interfacial
<b><i>Γ<sub>s</sub></i></b>	Excesso superficial
<b><i>E<sub>b</sub></i></b>	Energia por molécula no seio da solução
<b><i>E<sub>s</sub></i></b>	Energia por molécula na superfície da solução
<b><i>γ</i></b>	Tensão superficial

$\lambda$	Comprimento de onda
$PCE$	Parâmetro crítico de empacotamento
$IP$	Índice de polidispersão
$R_1$ e $R_2$	Raios principais de curvatura ortogonais
$W_{A,A}$	Energia de atração entre as moléculas
$Z_b$	Número de moléculas adjacentes no seio da solução
$Z_s$	Número de moléculas adjacentes na superfície
$\mu_0$	Permeabilidade magnética
$\beta$	Parâmetro de interação numa mistura de dois tensioativos
$c$	Velocidade de propagação da luz no vazio
$c'$	Velocidade de propagação da luz num dado meio
$C_0$	Curvatura espontânea
$x_i$	Fração molar
$\% \text{ m/m}$	Percentagem mássica

# I Introdução

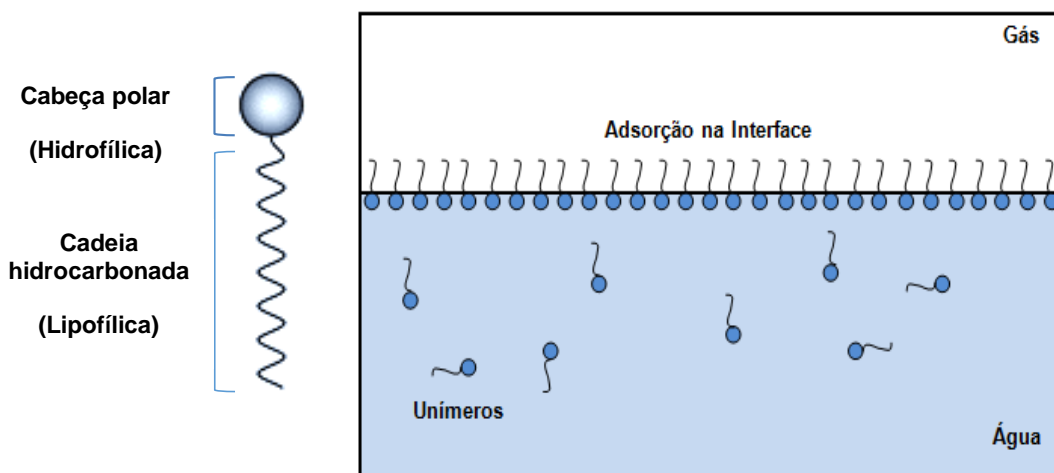
## 1.1. Tensioativos

### 1.1.1. Estrutura e propriedades básicas dos tensioativos

Os tensioativos fazem parte de uma vasta e versátil classe de compostos químicos, constituídos por duas regiões de diferente polaridade: um grupo polar (hidrofílico) e uma região apolar (lipofílica), geralmente uma cadeia hidrocarbonada (Figura 1.1). A existência de duas regiões distintas com diferentes afinidades relativamente a um dado solvente, água ou óleo, torna esta classe de compostos anfifílicos nesse solvente.

O efeito hidrofóbico, que é a principal força termodinâmica para a auto-agregação dos tensioativos, é uma consequência deste caráter anfifílico. As moléculas de tensioativo, quando dispersas em água, de modo a evitar as interações termodinamicamente desfavoráveis entre as cadeias hidrocarbonadas e o solvente, Figura 1.1, tendem a adsorver nas interfaces como água-ar e água-óleo, e reduzem drasticamente a tensão superficial/interfacial, tornando-se, por exemplo, excelentes estabilizadores de espumas e emulsões.

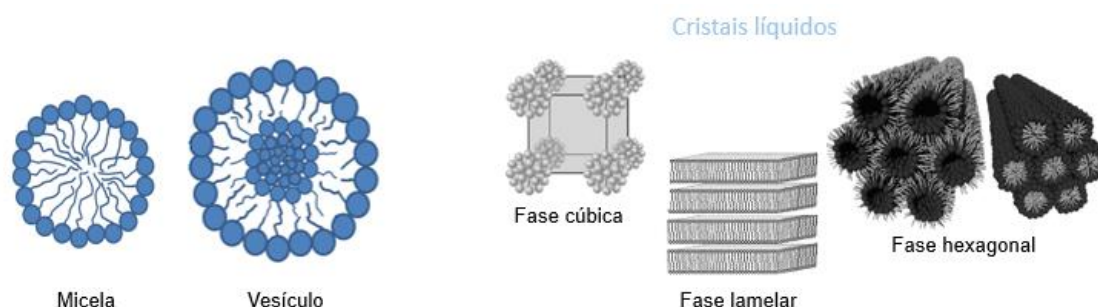
A redução da tensão superficial não ocorre indefinidamente. Acima da temperatura de solubilização (Temperatura de Kraftt,  $T_{Kf}$ ), e de um dado valor de concentração, as moléculas de tensioativo iniciam um processo de auto-agregação, com a formação de micelas. Tal processo acontece quando a concentração de unímeros em solução atinge um determinado valor (mais exatamente um estrito intervalo de concentração), denominado de concentração micelar crítica, *cmc*. Para além da *cmc*, as micelas coexistem com o unímeros livre em solução, cuja concentração permanece aproximadamente constante.<sup>1</sup>



**Figura 1.1** – Estrutura genérica e representação esquemática do comportamento de um tensioativo em solução (adsorção), para concentração inferior à *cmc*.

Para além dos agregados mais simples inicialmente formados (micelas), as moléculas de tensioativo podem organizar-se noutros tipos de estruturas maiores e mais complexas, tais como lipossomas, estruturas em bicamada, túbulos, cristais líquidos, microemulsões e emulsões.

A formação e sequência dos diferentes arranjos estruturais das moléculas de tensioativo em solução, Figura 1.2, dependem da estrutura molecular do tensioativo à partida, tal como a natureza do grupo polar e o número de cadeias hidrocarbonadas, bem como da concentração de tensioativo, temperatura, força iónica e outros fatores (nomeadamente, a adição de outros componentes, como óleo, co-surfactante, polímero, etc)



**Figura 1.2** – Estruturas auto-organizadas formadas por moléculas de tensioativo.

Por variação de parâmetros estruturais moleculares, podem obter-se tensioativos que apresentam diferentes propriedades físico-químicas. Habitualmente, e de acordo com a natureza do seu grupo polar, a classificação dos tensioativos varia desde aniónicos, catiónicos, não-iónicos, zwitteriónicos e cataniónicos. Cada uma destas classes contém grupos funcionais típicos na região polar da molécula anfifílica e propriedades interfaciais de diferente natureza.<sup>1</sup>

### Tensioativos Aniónicos

Os grupos polares mais comuns dos tensioativos aniónicos são os carboxilatos, sulfatos, sulfonatos e fosfatos, sendo os contra-íons mais utilizados o sódio, potássio, amónio, cálcio e várias aminas alquílicas protonadas (Figura 1.3). Estes tensioativos são geralmente sensíveis a águas duras, sendo os carboxilatos os mais sensíveis. São o grupo de tensioativos sintéticos mais vulgarmente utilizado, principalmente em formulações de detergentes e emulsificantes<sup>2</sup>.

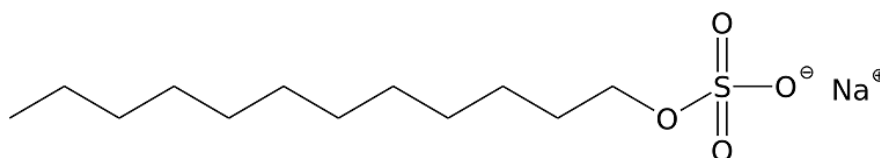


Figura 1.3 – Exemplo de um tensoativo aniónico: dodecilssulfato de sódio (SDS).

## Tensoativos Catiónicos

A grande maioria dos tensoativos catiónicos é constituída por grupos polares de amónio quaternário e aminas (Figura 1.4). As aminas só funcionam como tensoativo no seu estado protonado, não podendo por isso ser usadas a valores de pH elevados. Em contraste, os tensoativos de amónio quaternário não são sensíveis ao pH. As aplicações mais comuns dos tensoativos catiónicos estão relacionadas com a tendência destes tensoativos em adsorverem fortemente em superfícies carregadas negativamente, tais como metais, membranas celulares ou fibras. Como tal, estes compostos são tipicamente utilizados como agentes anti-corrosivos, dispersantes, agentes anti-estáticos e bactericidas.

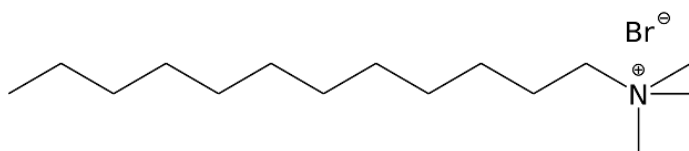


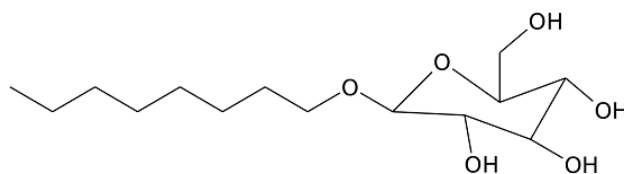
Figura 1.4 – Exemplo de um tensoativo catiónico: brometo de dodeciltrimetilamónio (DTAB).

## Tensoativos Não-Iónicos

Os tensoativos não iónicos compreendem moléculas anfífilas não carregadas, sendo a sua parte hidrofílica constituída por grupos polares de poliéteres ou polihidroxis, bem como unidades de oxi-etileno obtidas por polimerização de óxido de etileno. Neste último caso, os tensoativos designam-se por  $C_nE_m$ , em que  $n$  é o número de átomos C da cadeia hidrocarbonada e  $m$  o número de unidades oxietileno. Tensoativos derivados de açúcar também estão incluídos nesta categoria (Figura 1.5). Quanto maior for o número de unidades de óxido de etileno presentes no grupo polar para compostos  $C_nE_m$ , maior será a sua polaridade e a sua solubilidade na forma de unímero (maior  $cmc$ ). Com o aumento de temperatura, as unidades de óxido de etileno tornam-se menos polares, o que induz a desidratação dos grupos polares e altera

significativamente as propriedades de agregação (por exemplo, provocando uma transição micela-bicamada).<sup>1</sup>

Os tensioativos não-iônicos constituem a segunda classe de tensioativos mais usada, encontrando aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e higiene pessoal. Não são sensíveis a águas duras e apresentam elevada detergência e capacidade espumante.

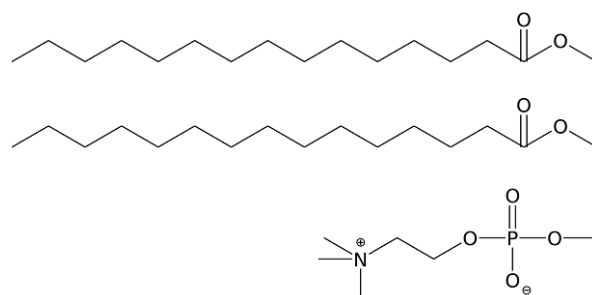


**Figura 1.5** – Exemplo de um tensioativo não-iônico, um octilglucosídeo.

### Tensioativos zwiteriônicos

Os tensioativos zwiteriônicos são moléculas anfífilas com dois grupos polares com carga de sinal oposto. A carga positiva é usualmente um grupo amónio, enquanto que a carga negativa é normalmente um grupo carboxilato ou fosfato (Figura 1.6).

Estes tensioativos para além de serem compatíveis com todos os outros tensioativos (apresentam sinergia e não causam processos de separação de fase), não são nocivos para a pele ou irritantes para os olhos, não sendo também sensíveis a águas duras. Têm propriedades dermatológicas relevantes, pelo que são amplamente utilizados em produtos de higiene pessoal.

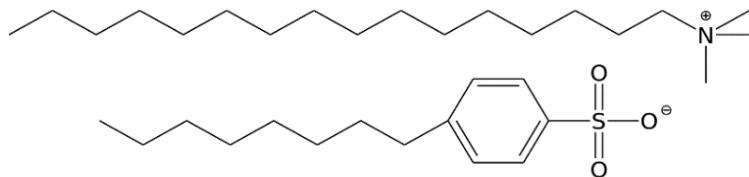


**Figura 1.6** – Exemplo de um tensioativo zwiteriônico: dimiristoílfosfatidilcolina (DMPC), um fosfolípido.

### Tensioativos cataniônicos

Os tensioativos cataniônicos constituem uma classe emergente de tensioativos, sendo obtidos por emparelhamento de moléculas anfífilas com carga de sinal oposto, com a correspondente remoção de contra-íons inorgânicos (Figura 1.7). No par cataniônico há associação eletrostática entre grupos polares, não existindo ligações covalentes entre as duas partes. O par cataniônico possui propriedades de agregação

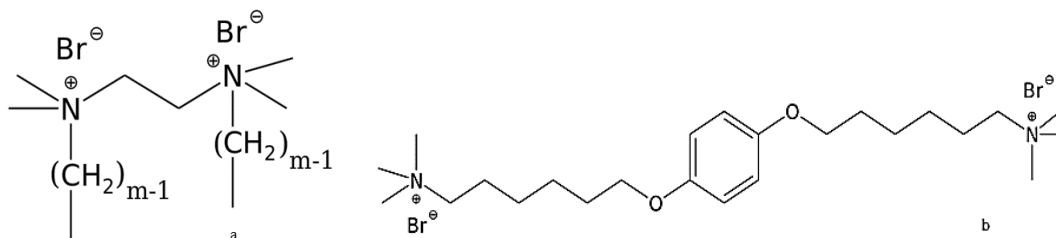
muito diferentes das dos tensioativos individuais dos quais é originado.<sup>3</sup> Os tensioativos apresentam frequentemente efeitos de sinergia interessantes, em particular a forte redução da concentração micelar crítica comparativamente aos tensioativos aniónicos e catiónicos que lhes dão origem.<sup>4</sup>



**Figura 1.7** – Exemplo de um tensioativo cataniónico: Hexadeciltrimetilamónio 4-octilbenzenosulfonato (TABSo)

Pode ainda referir-se outras classes de tensioativos importantes, no que concerne à sua configuração molecular. A procura de tensioativos com propriedades interfaciais e de auto-agregação melhoradas ou direccionadas fez com que os tensioativos gemini ou diméricos assumissem um lugar de destaque.<sup>5</sup> Os tensioativos gemini (Figura 1.8) apresentam dois grupos polares unidos por um espaçador de covalente estrutura e comprimento variável. Quando comparados com os seus análogos convencionais, possuem maior capacidade de baixar a tensão superficial, apresentam valores mais baixos de concentração micelar crítica, actividade interfacial mais elevada<sup>5</sup>, melhor poder de solubilização, melhor viscoelasticidade e melhorada capacidade de gelificação. Devido a estas características, os tensioativos gemini são utilizados nas mais diversas aplicações, desde, cosméticos e formulações alimentares, modelos para membranas e sistemas de entrega de genes e fármacos.<sup>6</sup>

Os tensioativos do tipo bolaforme são constituídos por dois grupos hidrofílicos, ligados a ambas as extremidades de uma cadeia hidrocarbonada. A maioria destes compostos têm sido estudados devido ao seu comportamento polimórfico em água, ou seja, em água formam diferentes tipos de estruturas, desde micelas a lipossomas. Quando dispersos em meio aquoso, após sonicação, estas moléculas de tensioativo auto-organizam-se frequentemente em monocamadas vesiculares, sendo estáveis durante um longo período de tempo a variações de temperatura ou a modificações de força iónica, podendo assim ser usados como modelos membranares.<sup>7, 8</sup>



**Figura 1.8** – a) Estrutura molecular do gemini n-2-m, com  $m = 12, 14, 16$  e  $18$ . Retirado de <sup>9</sup>. b) Estrutura molecular do tensioativo bolaforme  $C_6PhC_6$ . Retirado de <sup>8</sup>.

### 1.1.2. Comportamento de fase e agregação

A estrutura da molécula de tensioativo tem forte influência no processo de auto-agregação, o qual é essencialmente conduzido pelo efeito hidrofóbico. Este efeito caracteriza-se por um balanço subtil entre uma variação de entropia positiva para o processo de agregação e uma variação de entalpia cujo sinal é dependente da temperatura a que ocorre a agregação.<sup>10</sup> Globalmente, a variação de energia de Gibbs do processo tem, naturalmente, sinal negativo e quanto mais negativo, mais termodinamicamente favorável é o processo.

A agregação das moléculas anfífilas remove as cadeias hidrocarbonadas do contacto com o meio aquoso e este fator é favorável.<sup>11</sup> No entanto, surgem repulsões dos grupos polares na região interfacial dos agregados (por ex. na superfície das micelas). Estas repulsões podem ser de natureza eletrostática (repulsão entre regiões polares igualmente carregadas, em tensioativos iónicos) ou simplesmente devido ao impedimento estérico dos grupos polares hidratados (relevante sobretudo, para tensioativos não iónicos).<sup>12</sup>

As estruturas auto-agregadas podem subdividir-se em dois grupos distintos:

- **Fases de solução:** micelas, micelas invertidas, microemulsões e lipossomas. Estas fases caracterizam-se por serem isotrópicas, isto é, apresentam propriedades idênticas ao longo de todo o espaço tridimensional.

- **Fases líquido-cristalinas:** fases hexagonais, fases lamelares e fases cúbicas. Este tipo de fases são um estado intermédio entre o estado sólido e o estado líquido, e com a exceção da fase cúbica (que é isotrópica), são fases estruturalmente anisotrópicas, ou seja têm propriedades físicas que dependem da direção escolhida no sistema de eixos de referência.

Para fazer previsões acerca do tamanho e a forma dos agregados anfífilos, é necessário um modelo teórico que relacione os parâmetros moleculares (como o volume hidrofóbico, comprimento de cadeia e a área do grupo polar) e as variáveis intensivas (como a temperatura e a força iónica) para a microestrutura.<sup>12</sup> Assim, tanto o tipo de grupo polar como a configuração da cadeia hidrofóbica irá determinar o tipo de agregado formado, já que, para uma molécula, há um número limitado de agregados que permitem que as duas porções que constituem o tensioativo (hidrofílica e hidrofóbica) interatuem favoravelmente com moléculas adjacentes.

O modelo do parâmetro crítico de empacotamento, PCE, permite racionalizar qualitativamente a relação estrutura molecular/agregação e prever alterações na agregação por variação de composição, força iónica, temperatura, etc. O parâmetro



crítico de empacotamento relaciona a forma do monómero de tensioativo com a morfologia preferencial dos agregados e é expresso através da expressão: <sup>10, 11, 13, 14</sup>

$$PCE = \frac{V_{hc}}{a_0 l_{hc}} \quad (1.1)$$

O parâmetro  $a_0$  é definido como a área do grupo polar na interface do agregado, sendo  $V_{hc}$  e  $l_{hc}$  o volume e o comprimento da cadeia hidrocarbonada distendida, respetivamente. O valor de  $a_0$  não é uma simples área geométrica baseada na estrutura química do grupo polar, mas pode tomar valores distintos para a mesma molécula de tensioativo consoante as condições de solução, temperatura, aditivos e concentração de sal, não sendo possível a associação de uma área específica a um determinado grupo polar. <sup>15</sup>

O tamanho das micelas aumenta com o número de carbonos da cadeia alquílica do tensioativo. O número de agregação para uma micela esférica formada por um tensioativo com uma cadeia hidrofóbica  $C_n H_{2n+1}$  pode ser avaliado por:

$$N_s = \frac{4\pi l_{hc}^3}{3V_{hc}} \quad (1.2)$$

O volume de uma cadeia hidrocarbonada saturada, em  $\text{nm}^3$ , pode ser calculado pela expressão: <sup>12</sup>

$$V_{hc} = 0,027n_{CH_2} + 0,055n_{CH_3} \quad (1.3)$$

onde  $n_{CH_2}$  representa o número total de grupos  $CH_2$  e  $n_{CH_3}$  o número de grupos metilo.

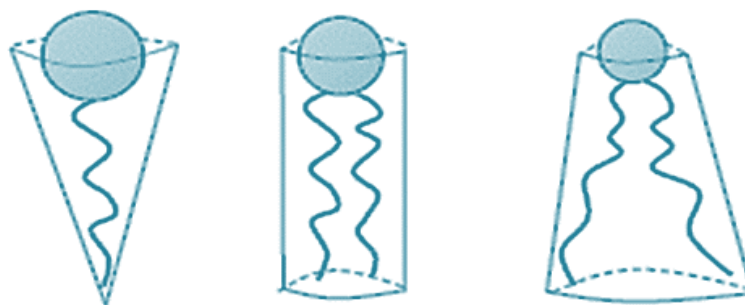
Pode-se determinar-se o comprimento máximo (em nm) de uma cadeia totalmente a partir da expressão:

$$l_{hc} = 0,15 + 0,13n_{CH_2} \quad (1.4)$$

O valor 0.15 nm nesta equação advém do raio de Van der Waals do grupo metilo terminal (0.21 nm), menos a metade de comprimento de ligação do primeiro átomo não inserido no núcleo hidrocarbonado. O valor 0.13 nm deriva do comprimento de ligação carbono-carbono projetada na direção da cadeia na configuração trans.

A área do grupo polar,  $a_0$ , é o valor mais difícil de quantificar, pois depende da concentração de tensioativo em solução e da presença de eletrólitos (no caso de tensioativos iónicos) que influenciam a distância entre cada grupo polar. Para os tensioativos não-iónicos ou zwitteriónicos,  $a_0$  é mais insensível às condições externas, mas a tarefa de calcular este parâmetro continua a apresentar dificuldades. No entanto, em geral pode prever-se a tendência de variação de  $a_0$  para uma mudança de um parâmetro experimental (por ex., pH, temperatura, força iónica), e esse facto pode ser bastante útil para a interpretação qualitativa dos dados experimentais.<sup>12</sup>

Tendo em consideração o parâmetro crítico de empacotamento, os agregados formados por tensioativos podem ser entendidos como resultando do empacotamento de sólidos geométricos com minimização da área interfacial. É necessário definir, para cada tipo de tensioativo, uma forma geométrica associada e a respetivo agregado mais plausível (Figura 1.9).



**Figura 1.9** – Representação de diferentes tipos de formas geométricas utilizadas no empacotamento de tensioativos.

**Cone simples** ( $1/3 < \text{PCE} < 1/2$ ) - este tipo de geometria é característico de tensioativos de cadeia simples e favorece a formação de micelas;

**Cilindros** ( $\text{PCE} \approx 1$ ) – geometria típica para tensioativos de dupla cadeia, que favorece a formação de bicamadas;

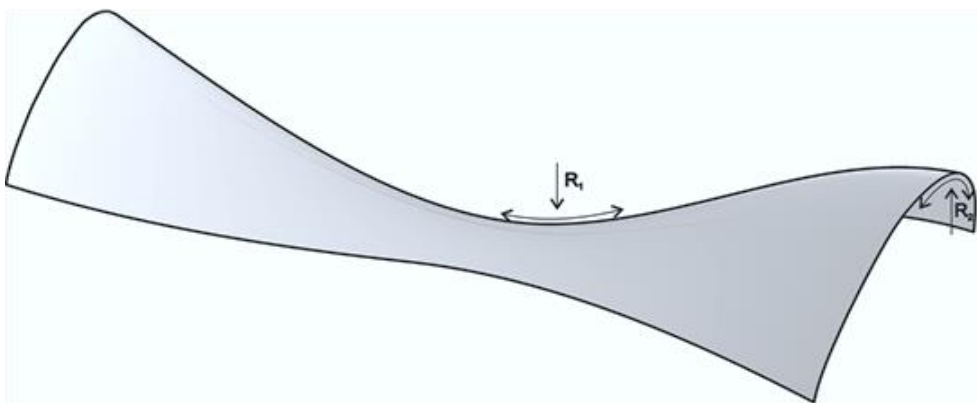
**Cones truncados** ( $\text{PCE} > 1$ ) – geometria típica de tensioativos que possuem uma região polar diminuta quando comparada com a volumosa cadeia alquílica, e que favorece a formação de micelas invertidas.

Um modelo alternativo para a compreensão e racionalização do processo de auto-agregação molecular baseia-se no conceito de curvatura espontânea da superfície

do agregado,  $c_0$ . Pode-se definir curvatura média,  $c$ , de um ponto na superfície de um dado agregado por:

$$c = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (1.5)$$

onde  $R_1$  e  $R_2$  são os raios de curvatura em duas direções perpendiculares, como se evidencia na Figura 1.10. Para a atribuição de cada sinal de raio, é aceite, por convenção, a direção normal ao filme de tensioativo e apontada para a região polar. Assim, uma curvatura positiva corresponde a fases diretas (normais) e uma curvatura negativa origina fases invertidas. A curvatura espontânea do filme é a curvatura média que o filme adota para minimização da energia de Gibbs do sistema.

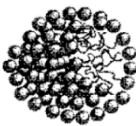

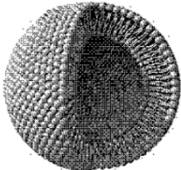
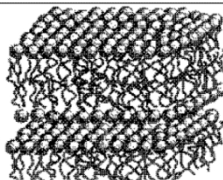
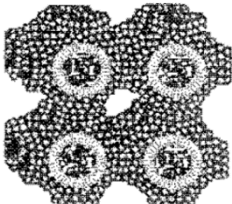
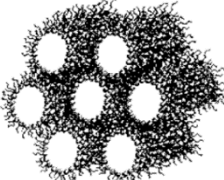
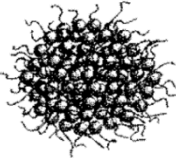


**Figura 1.10** Representação dos raios principais de curvatura,  $R_1$  e  $R_2$ , que são mutuamente perpendiculares e têm sinais contrários.

A tabela 1.1 mostra a relação entre o PCE e o valor de curvatura espontânea, para as diferentes formas de agregação.

De modo a fazer-se uma previsão e compreender as mudanças de forma dos agregados micelares, o PCE torna-se um parâmetro muito útil e poderoso. Para além disso, o PCE está interligado com a curvatura espontânea do filme monomolecular que o tensioativo pode formar.<sup>16</sup>

**Tabela 1.1** – Relação entre PCE,  $c$  e diferentes estruturas auto-organizadas

Fase	PCE e $c$	Estrutura dos Agregados	Características
Solução Micelar	$PCE < \frac{1}{3}$ $c = \frac{1}{R}$		- Geralmente esféricos, podendo adotar outras geometrias tais como discos, prolatos, oblatos e bastonetes. - Isotropia ótica e estrutural.
Cristal Líquido Hexagonal	$\frac{1}{3} < PCE < \frac{1}{2}$ $c = \frac{1}{2R}$		- Micelas cilíndricas dispostas em arranjo hexagonal, sendo que cada micela é rodeada por seis micelas diferentes. - Anisotropia ótica e estrutural
Estruturas Vesiculares	$\frac{1}{2} < PCE < 1$		- Agregados esféricos com uma membrana em bicamada. Isotropia ótica e estrutural, execto em estruturas multilamelares que podem apresentar anisotropia ótica
Cristal Líquido Lamelar	$PCE \approx 1$ $c = 0$		- Fase anisotrópica formada por bicamadas separadas por solvente.
Cristal Líquido Cúbico	$PCE \geq 1$ $c = 0$ ou $c = -\frac{1}{R}$		- Agregados micelares organizados em geometria cúbica (fase cúbica discreta, I), ou através da construção de um filme de tensioativo contínuo e infinito em relação a ambos os domínios hidrofóbico e hidrofílico (fase cúbica bicontínua, V). - Fase Isotrópica
Cristal Líquido Hexagonal Invertido	$PCE > 1$		- Apresentam a mesma geometria que a fase hexagonal ou micelar direta, à exceção da orientação das moléculas.
Cristal Líquido Micela Invertida	$c = -\frac{1}{R}$		As cadeias hidrofóbicas estão em contacto com o solvente.

Para além da estrutura do tensioativo, existem outros parâmetros externos, que afetam o parâmetro de empacotamento e a curvatura espontânea. Dentro destes parâmetros estão compreendidos fatores como a temperatura, a adição de sal, co – solutos e concentração de tensioativo.<sup>1,2</sup>

**Temperatura** – Para os tensioativos iónicos, a temperatura exerce um efeito modesto no parâmetro crítico de empacotamento e na curvatura espontânea. Para os tensioativos não-iónicos, do tipo  $C_nE_m$ , a temperatura tem um grande impacto. Um aumento de temperatura faz com que os grupos polares se tornem menos hidrofílicos, o que acarreta uma diminuição da área do grupo polar.<sup>1,2</sup> Tal facto favorece o aumento do *PCE* e um decréscimo no valor de curvatura espontânea. Dependendo do tipo de tensioativo não-iónico, um aumento moderado de temperatura pode levar a que a forma de agregação se altere significativamente, passando-se por exemplo de micelas normais a baixa temperatura para estruturas planares ou mesmo invertidas a temperatura mais elevada.

**Adição de sais** – A área da região polar efetiva dos tensioativos é maior que o seu tamanho físico real devido à repulsão eletrostática ou estérica.<sup>1,2</sup> No caso dos agregados de tensioativos iónicos, onde existem repulsões eletrostáticas entre os grupos polares, a adição de sal irá provocar um efeito de *screening* (blindagem) das repulsões. Consequentemente, a área do grupo polar decresce, e como tal o parâmetro de empacotamento aumenta, enquanto que, por outro lado, a curvatura espontânea diminui.

**Co-tensioativos** – A interação entre tensioativos e co-tensioativos (ex:octanol) geralmente produz um aumento do parâmetro de empacotamento e um decréscimo da curvatura espontânea.

**Concentração de tensioativo** – Aumentando a concentração de tensioativo, o volume disponível para os agregados torna-se menor; portanto, a interação entre agregados é fortalecida. Quando esta interação se torna muito intensa, os agregados tendem a organizar-se para preencher de forma mais eficiente o volume disponível.

Para os tensioativos iónicos, um decréscimo na água disponível aumenta a concentração efetiva de contra-íões o que irá reduzir a área do grupo polar. Assim, ocorre uma mudança progressiva de uma curvatura espontânea positiva para uma curvatura espontânea negativa. Este efeito pode ser descrito pelo diagrama de Fontell.

## Diagrama de Fontell

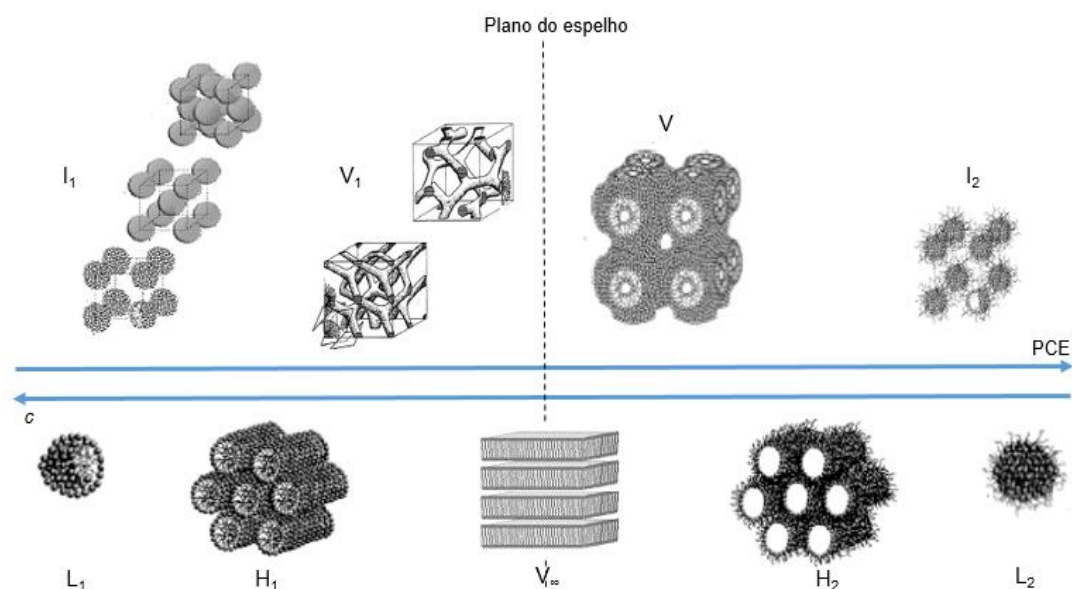
Como visto anteriormente, à medida que a concentração de tensioativo aumenta, as interações inter-micelares aumentam. A um determinado valor de concentração, formam-se cristais líquidos, que podem surgir em diversas formas (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** – Notações adotadas para as várias fases líquido-cristalinas

Fases	Notação utilizada
Lamelar	$L_{\infty}$
Hexagonal	$H_1$
Hexagonal Invertida	$H_2$
Cúbica (micela normal)	$I_1$
Cúbica (micela invertida)	$I_2$
Cúbica (bicontínua normal)	$V_1$
Cúbica (bicontínua invertida)	$V_2$
Micelar	$L_1$
Micelar invertida	$L_2$

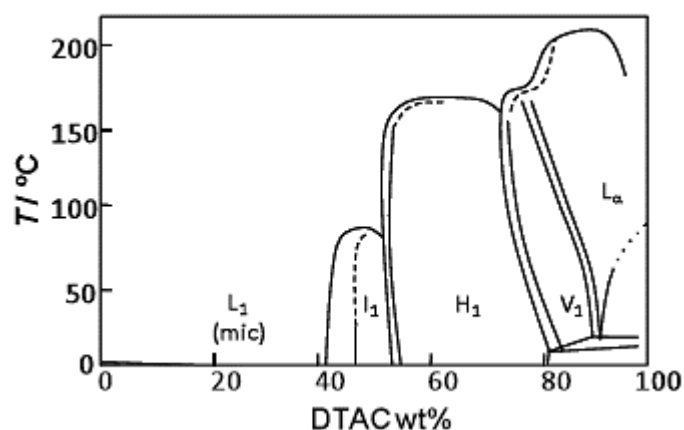
O conhecimento do comportamento de fase de um sistema tensioativo/água é de grande importância em aplicações práticas, uma vez que cada fase possui uma característica específica que determina as propriedades físico-químicas da solução.

De acordo com o diagrama de Fontell (Figura 1.11), aumentando a concentração de tensioativo na mistura tensioativo/água, as estruturas vão variando de forma, obedecendo à seguinte sequência: micela esférica, fase cúbica, fase hexagonal, fase cúbica, fase lamelar e as correspondentes fases invertidas.<sup>2</sup> Nem todos os tensioativos adotam toda esta sequência de fases, contudo a sequência em função da concentração, é, na maioria dos casos, respeitada.



**Figura 1.11** – Diagrama de Fontell: sequência lógica ideal de mesofases com a variação da concentração de tensoativo. Retirado de <sup>17</sup>

Num diagrama de fases de um sistema binário tensoativo-água, as fases líquido-cristalinas geralmente ocupam uma gama alargada de composição. A figura 1.12 mostra um diagrama de fase para um tensoativo iónico.



**Figura 1.12** – Diagrama de fase representativo para o tensoativo iónico DTAC. Retirado de <sup>17</sup>

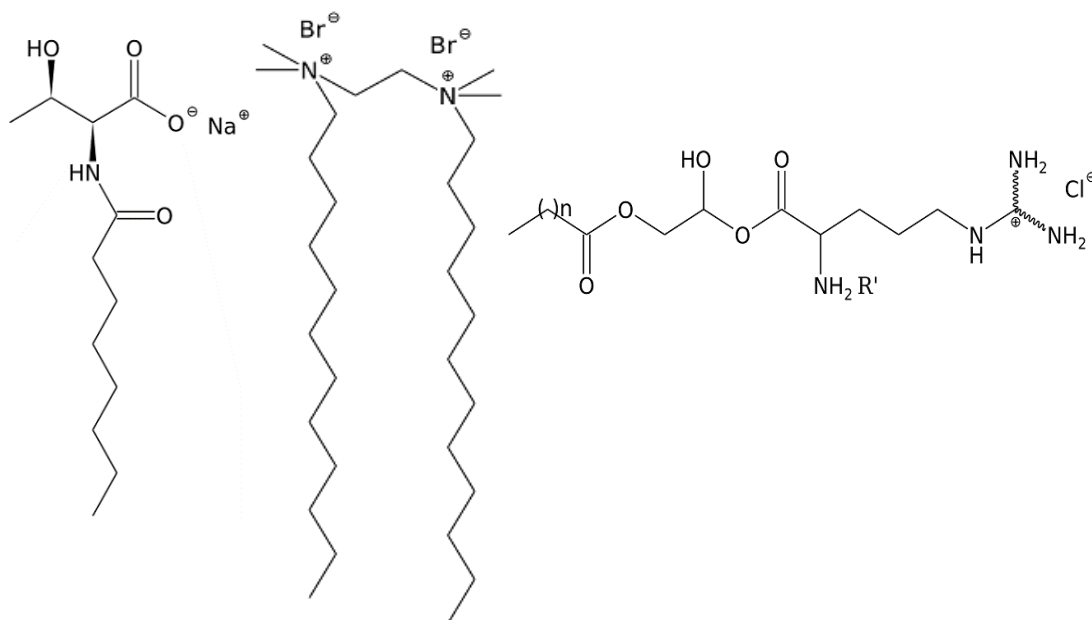
### 1.1.3. Tensioativos derivados de aminoácidos

Os aminoácidos são moléculas orgânicas que servem de base à construção de péptidos e proteínas. Ocorrem naturalmente na forma  $R-CH(NH_2)-COOH$ , onde R pode ser um grupo alquil ou alil. Através da hidrólise das proteínas é possível obter vinte

aminoácidos padrão distintos, estando estes na forma  $\alpha$ -aminoácidos (grupo amina ligado ao átomo de carbono adjacente ao grupo carboxílico).<sup>18</sup>

Os aminoácidos são moléculas excelentes para a modificação e conversão em tensioativos.<sup>19</sup> Neste contexto, os tensioativos derivados de aminoácidos pelo facto de serem obtidos de fontes naturais, apresentarem biocompatibilidade melhorada, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade no ambiente, bom desempenho interfacial e estruturas de auto-agregação interessantes, têm sido recentemente considerados como uma estratégia promissora e uma alternativa viável aos tensioativos de origem petroquímica, reduzindo o impacto ambiental e poupando recursos fósseis.<sup>20</sup>

De acordo com a sua estrutura, existem essencialmente três categorias de tensioativos derivados de aminoácidos. A molécula de aminoácido situa-se na região polar do tensioativo, e esta, quando associada a longas cadeias alquílicas, pode dar origem a tensioativos lineares ou de cadeia simples, tensioativos diméricos ou gemini e tensioativos com estrutura glicerolípídica.<sup>21</sup> (Figura 1.13)



**Figura 1.13** – Tensioativos derivados de aminoácidos: a) tensioativo de cadeia simples; b) tensioativo gemini; c) tensioativo com estrutura glicerolípídica. Retirado de <sup>21</sup>

Como verificado na figura acima, a arquitetura base do aminoácido permite o desenho de várias estruturas para as moléculas de tensioativo, uma vez que as cadeias alquílicas podem ser incorporadas no grupo amina ou carboxilo, ou mesmo em grupos funcionais presentes na cadeia lateral do aminoácido.

Como referido anteriormente, estes tensioativos apresentam também vantagens para o processo de auto-agregação. Para além de micelas e lipossomas, estes



tensioativos têm a capacidade de formar agregados supramoleculares em solução mais complexos, tais como fitas, fibras, hélices e túbulos, como consequência do estabelecimento de pontes de hidrogénio (em vários locais) intermoleculares e da existência de um centro quiral.<sup>22-24</sup>

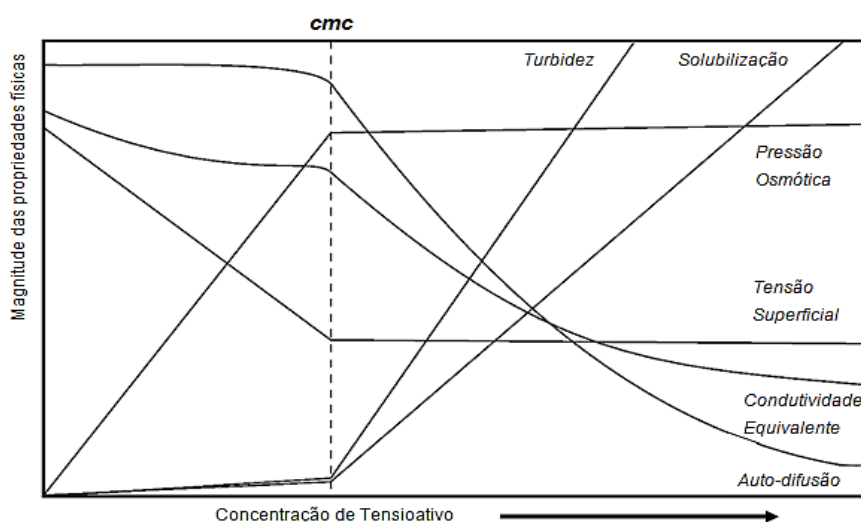
Neste trabalho, e de forma a verificar as vantagens associadas ao uso de tensioativos derivados de aminoácidos, em comparação com tensioativos de origem petroquímica, estudou-se uma nova série de tensioativos derivados do aminoácido treonina, com cadeia alquílica de comprimento crescente.

Foram medidas propriedades interfaciais, tais como a concentração micelar crítica, o excesso superficial máximo e a área molecular mínima para cada tensioativo. Tratando-se de compostos com grupos carboxilatos, cuja protonação é dependente do pH, os estudos referidos, foram realizados com e sem ajuste de pH. Depois de reunidos os resultados, os valores obtidos da nova série de compostos foram comparados com os tensioativos homólogos comercialmente disponíveis.

## 1.2. Micelização

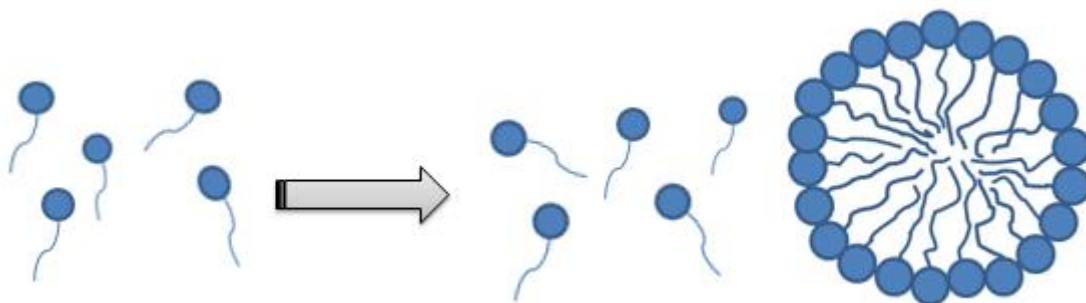
### 1.2.1. Concentração micelar crítica e estrutura micelar

A capacidade que os tensioativos apresentam em adsorverem nas interfaces ou superfícies de um dado sistema é uma das propriedades fundamentais dos tensioativos. Quando se adiciona um tensioativo à água, este vai dissolver-se continuamente sob a forma de unímero até que se atinja a *cmc*. A partir desta concentração, todo o tensioativo que for adicionado à solução é dissolvido sob a forma de micelas. A Figura 1.14 evidencia a variação das diferentes propriedades físicas das soluções com o aumento de concentração de tensioativo em solução. Para todas as propriedades, dá-se um ponto de inflexão da tendência, quando a *cmc* é obtida.



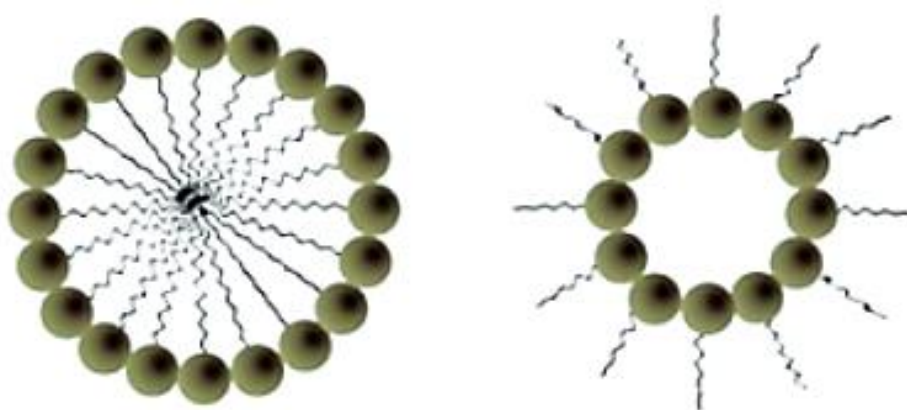
**Figura 1.14** – Representação esquemática da variação de algumas propriedades físicas de uma solução aquosa de tensoativo com a concentração.

Para além de ser a concentração na qual se começam a formar os agregados micelares, a *cmc* indica qual a concentração máxima atingida por um tensoativo na forma de unímero em solução (Figura 1.15).



**Figura 1.15** – Esquema representativo da formação de micelas.

Observando a estrutura de uma micela (Figura 1.15), verifica-se que as cadeias hidrofóbicas ficam direcionadas para o interior, enquanto que as cabeças polares estão dirigidas para o solvente. Assim sendo, a micela é um agregado com uma grande solubilidade em água e não possui atividade interfacial. Se, em detrimento da água, estivermos perante um solvente apolar, as micelas apresentam uma configuração invertida, Figura 1.16. No caso das micelas invertidas, o grupo polar fica direcionado para o interior do agregado.



**Figura 1.16** – Exemplo esquemático de uma micela e uma micela invertida, respetivamente.

Muitas representações esquemáticas de micelas mostram os unímeros empacotados de forma ordenada, constituindo uma estrutura uniforme. Na realidade tal não acontece, sendo as micelas agregados onde as cadeias hidrocarbonadas estão em elevada desordem conformacional e a superfície é relativamente irregular, devido à dinâmica molecular, interação com o solvente e processos de troca unímero-micela.<sup>25</sup>

A agregação dos unímeros de tensioativo é um processo altamente dinâmico e é impulsionado pelas interações hidrofóbicas entre as cadeias hidrocarbonadas do tensioativo e o solvente polar. Quando estas cadeias são postas em contato com a água, o sistema, de modo a minimizar a sua energia de Gibbs, tende a eliminar os contatos água-cadeia hidrocarbonada, resultando daí a formação de micelas. A formação das micelas é um processo espontâneo e cooperativo.<sup>16, 26</sup> Este processo de agregação ocorre acima da temperatura de Krafft do tensioativo, em que a solubilidade do tensioativo aumenta significativamente havendo formação de micelas. Interações eletrostáticas entre os grupos polares de tensioativo e interações estéreas, resultantes do empacotamento dos mesmos grupos na superfície e dos grupos hidrofóbicos no 'núcleo', fazem parte das diversas interações repulsivas que condicionam a formação de micelas.<sup>26, 27</sup>

### 1.2.2. Modelos termodinâmicos de micelização

Para a determinação dos diferentes parâmetros termodinâmicos inerentes ao processo de micelização podem ser utilizados dois modelos termodinâmicos: o modelo da ‘pseudo-separação de fases’ e o modelo de ‘ação de massas’.<sup>12</sup> O modelo da ‘pseudo-separação de fases’ é construído com base na analogia existente entre o início da formação da micela e um processo de separação de fases. Esta analogia torna-se notória considerando a elevada cooperatividade do processo de micelização. Assumindo a coexistência entre unímeros e micelas, e sendo a concentração dos unímeros igual à  $cmc$ , o potencial químico do tensioativo na forma de unímeros pode ser descrito pela seguinte equação:

$$\mu_u = \mu_u^0 + RT \ln cmc \quad (1.6)$$

onde  $\mu_u^0$  é o potencial químico padrão do unímero,  $R$  é a constante de gases reais,  $T$  a temperatura absoluta e a  $cmc$  é expressa em fração molar de tensioativo (usa-se com estado de referência uma solução idealmente diluída de tensioativo); considera-se ainda nesta expressão, o coeficiente de atividade do soluto como unitário.

Neste modelo, as micelas são consideradas como sendo uma fase diferente (condensada), logo o potencial químico nas micelas,  $\mu_m$ , é igual ao potencial químico padrão nas micelas,  $\mu_m^0$ :

$$\mu_m = \mu_m^0 \quad (1.7)$$

No equilíbrio fásico, os potenciais químicos em 1.6 e 1.7 igualam-se. Consequentemente, a energia de Gibbs de micelização padrão,  $\Delta G_m^0$ , que é a diferença entre o potencial químico padrão do unímero na micela e o potencial químico padrão do unímero livre em solução, pode ser escrita como:

$$\Delta_{mic} G_m^0 = \mu_m^0 - \mu_u^0 = RT \ln cmc \quad (1.8)$$

Embora este modelo se constitua como uma aproximação bastante útil para obter  $\Delta G_m^0$  e forneça uma descrição do início do processo de agregação, não descreve o seu final. Ora, as micelas são agregados de dimensão finita e com um número de agregação bem definido na  $cmc$  (tal como se sabe de dados experimentais).

O outro modelo utilizado, o modelo da ‘ação de massa’ considera a agregação como um equilíbrio termodinâmico e tem como parâmetro fundamental o número de

agregação da micela,  $N$ . Este modelo considera que existe um número de agregação preferencial,  $N$ . Assim,  $N$  unímeros de tensioativo,  $S$ , formam um agregado,  $S_N$  de acordo com o equilíbrio:



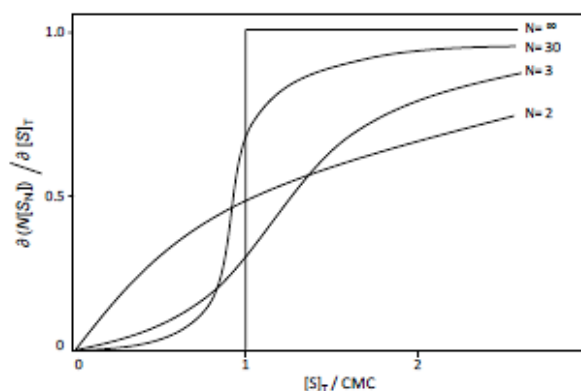
ao qual corresponde uma constante de equilíbrio,  $K_N$ ,

$$K_N = \frac{[S_N]}{[S]^N} \quad (1.10)$$

Tendo apenas unímeros e  $N$ -agregados, a concentração total de tensioativo é dada por:

$$[S]_{total} = N[S_N] + [S] = N K_N [S]^N + [S] \quad (1.11)$$

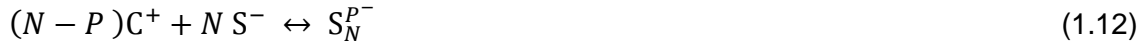
Usando as equações 1.10 e 1.11, pode obter-se a fração de tensioativo total incorporado em micelas através da derivada  $\frac{\partial \{N[S_N]\}}{\partial [S]_t}$ . A figura 1.17 mostra a variação de  $\frac{\partial \{N[S_N]\}}{\partial [S]_t}$  em função da concentração total de tensioativo, para diferentes valores de  $N$ . Quando  $N$  tende para infinito, obtém-se o resultado de ‘separação de fase’ com uma descontinuidade na derivada para o valor de  $cmc$ . Para valores finitos de  $N$ , o processo de agregação é gradual e, por definição, a  $cmc$  é obtida no ponto  $\frac{\partial \{N[S_N]\}}{\partial [S]_t} = 0.5$ .



**Figura 1.17** - Fração de tensioativo que incorpora a micela,  $d(N[S_N])/d([S]_t)$ , versus a concentração de tensioativo total,  $[S]_t$ . Retirado de <sup>12</sup>

Ambos os modelos descritos anteriormente descrevem o processo de micelização para os tensioativos não-iónicos. Para os tensioativos iónicos, a presença

de contra-íões na micela terá de ser tida em consideração. Para o caso dos tensioativos iónicos, as equações 1.9 e 1.10 terão de ser reescritas, considerando o equilíbrio entre os unímeros de tensioativo,  $S^-$ , os contra-íões,  $C^+$ , e as micelas,  $S_N$ , como:



ao qual corresponde a constante de equilíbrio:

$$K_N = \frac{[S_N^{P-}]}{[S^-]^N [C^+]^{N-P}} \quad (1.13)$$

onde  $P$  é a carga da micela. A energia de Gibbs molar de micelização padrão é dada por:

$$\Delta_{mic} G_m^0 = \frac{\Delta_{mic} G^0}{N} = -\frac{RT}{N} \ln[S_N^{P-}] + RT \ln[S^-] + RT \left(1 - \frac{P}{N}\right) \ln[C^+] \quad (1.14)$$

Quando  $N$  se encontra entre 50-100 (o valor mais comum para o caso de tensioativos iónicos e micelas esféricas) e se considera que na *cmc*  $[S^-] \cong [C^+]$ , a equação anterior pode ser descrita como:

$$\Delta_{mic} G_m^0 = (2 - \alpha) RT \ln C_{cmc} \quad (1.15)$$

onde  $\alpha = P/N$ , designando-se como o grau de dissociação dos contra-íões na micela ou grau de ionização micelar.

Combinando a equação 1.15 com a equação de Gibbs-Helmholz, pode obter-se uma equação que permite o cálculo da entalpia do processo de micelização, conhecida a forma funcional de dependência da *cmc* com a temperatura:

$$\Delta_{mic} H^0 = -(2 - \alpha) RT^2 \left( \frac{\partial \ln cmc}{\partial T} \right)_p \quad (1.16)$$

### 1.2.3. Fatores influenciadores da *cmc*

A *cmc* é uma propriedade intrínseca e característica de cada tensioativo, e depende de vários fatores, tais como a sua estrutura química, temperatura ou presença de eletrólitos.<sup>2</sup>

**Grupo hidrofóbico** – É o fator que mais determina a *cmc* de um tensioativo. Para uma série de tensioativos, à medida que o número de carbonos da cadeia hidrocarbonada aumenta, o valor da *cmc* diminui logaritmicamente. Para os tensioativos iónicos, a relação entre a *cmc* e o tamanho da cadeia hidrocarbonada pode ser descrita pela equação de Klevens,<sup>28</sup>:

$$\log(\text{cmc}) = A - Bn_c \quad (1.17)$$

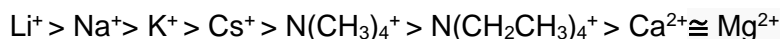
onde a *cmc* é expressa em mol/dm<sup>-3</sup>,  $n_c$  corresponde ao número de carbonos da cadeia hidrocarbonada e A e B são constantes específicas para uma série homóloga, fixando-se o valor de temperatura e pressão. O valor de A é praticamente constante para um grupo polar iónico particular, enquanto que B é constante e praticamente igual a log 2 para todos os sais que possuem um único grupo polar iónico comum. Na tabela 1.3 estão representados alguns exemplos da constante de Klevens para vários tensioativos.

**Tabela 1.3** – Constantes de Klevens para vários tipos de tensioativos

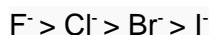
Série de tensioativos	$\theta / ^\circ\text{C}$	A	B
n-alkilcarboxilatos de sódio (sabões)	20	1.85	0.30
n-alkilcarboxilatos de potássio (sabões)	25	1.92	0.29
n-alkil-1-sulfatos de sódio	45	1.42	0.30
n-alkil-2-sulfatos de sódio	55	1.28	0.27
n-alkil-1-sulfonatos de sódio	40	1.59	0.29
p-n-alkilbenzossulfonatos de sódio	55	1.68	0.29
Cloretos de n-alkilamónio	25	1.25	0.27
Brometos de trimetilamónio	25	1.72	0.30
Brometos de n-alkilpiridinas	30	1.72	0.31

**Grupo hidrofílico** – Usualmente, os tensioativos catiónicos apresentam *cmc* ligeiramente mais elevada que os aniónicos. Nos casos dos tensioativos não-iónicos, há um aumento moderado na *cmc* à medida que o grupo polar aumenta de tamanho.

**Contra-íão** – Para uma dada cadeia hidrofóbica, e tendo em conta um grupo polar aniónico, o valor da *cmc* decresce segundo a seguinte ordem:



No caso do grupo polar ser catiónico, o valor de *cmc* diminui segundo a ordem:



**pH** – Os tensioativos que são alquilcarboxilatos de catiões têm um comportamento em solução que depende do valor de pH da solução. Como o grupo carboxilato não está completamente ionizado, próximo ou abaixo do  $\text{pK}_a$ , a mudança do pH pode resultar em alterações significativas na *cmc*. Um efeito quase nulo do pH na *cmc* é verificado para os tensioativos não-iónicos.

**Temperatura** – De um modo geral, pode considerar-se que a *cmc* tem uma dependência muito pequena com a temperatura. Para muitos tensioativos iónicos, verifica-se, ainda assim, que a *cmc* varia de forma não linear entre os 0 e os 70 °C, atingindo um mínimo próximo da temperatura ambiente. No caso dos tensioativos não-iónicos de tipo  $\text{C}_n\text{E}_m$ , a *cmc* baixa continuamente com a temperatura, mas a variação é igualmente pouco acentuada.

#### 1.2.4. Temperatura de Krafft

Como se sabe, a temperatura exerce um efeito dramático na solubilidade de muitos tensioativos iónicos. Assim, tem-se que a solubilidade dos tensioativos aumenta com a temperatura. É frequentemente observado um aumento brusco e descontínuo na solubilidade a uma determinada temperatura, designada como temperatura de Krafft ou ponto de Krafft.<sup>2</sup> A temperatura de Krafft pode também ser descrita como a temperatura mínima a partir da qual os tensioativos formam micelas, isto é, onde a solubilidade do composto iguala a *cmc*. Por este motivo, também é conhecida como Temperatura micelar crítica.

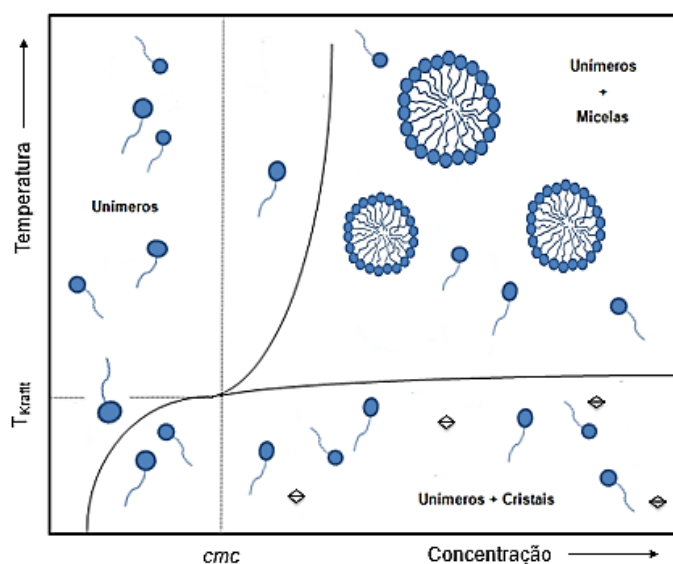
Abaixo da temperatura de Krafft a solubilidade do tensioativo é determinada pela energia de rede cristalina e pela entalpia de hidratação do sistema, enquanto que acima



desta temperatura, a solubilidade do unímero aumenta até ao início do processo de micelização e os agregados passam a ser termodinamicamente estáveis<sup>29</sup>, como descrito na Figura 1.18.<sup>2</sup>

A temperatura de Krafft pode ser afetada por vários fatores:

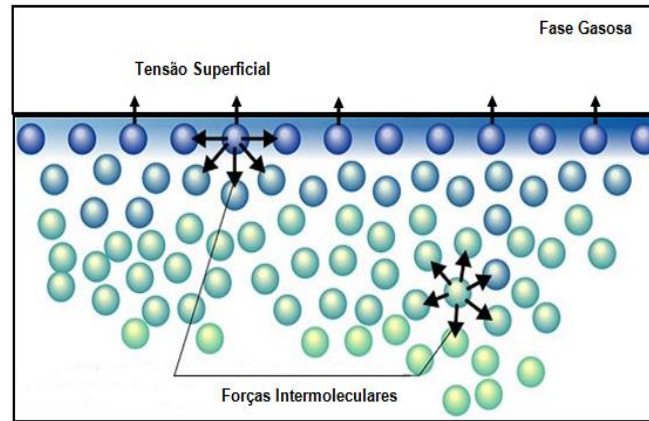
- A temperatura de Krafft aumenta significativamente com o aumento das cadeias hidrofóbicas. Contudo este comportamento não é regular.
- A natureza do grupo polar e o respetivo contra-íão são fatores que exercem um largo efeito na temperatura de Krafft. A adição de sal normalmente aumenta a temperatura de Krafft; no caso particular do contra-íão não se verifica uma tendência universal quanto ao seu efeito.



**Figura 1.18** – Representação esquemática de um diagrama de fase para um sistema binário tensoativo-água, destacando-se a temperatura de Krafft e a concentração micelar crítica.

### 1.2.5. Tensão superficial

A diferença entre a energia das moléculas localizadas à superfície de um líquido e no seio da solução manifesta-se através da existência de uma tensão superficial.<sup>12</sup> As interações intermoleculares no seio da solução são mais intensas do que aquelas verificadas à superfície (Figura 1.19). A passagem de uma molécula situada no seio da solução para a superfície leva a um aumento da área desta, sendo necessário aplicar trabalho de modo a compensar a diferença de energia entre a superfície e o seio da solução. O líquido tende assim a minimizar a sua área superficial para um dado volume.<sup>12</sup>



**Figura 1.19** – Moléculas e respetivas forças presentes num líquido.

Tendo em conta um líquido puro em equilíbrio com o seu vapor, a energia por molécula presente no seio da solução é dada por:

$$E_b = \frac{Z_b}{2} W_{A,A} \quad (1.18)$$

onde  $Z_b$  representa o número de vizinhos próximos no seio da solução e  $W_{A,A}$  a energia de atração entre as moléculas. Na superfície, a energia por molécula é dada por:

$$E_s = \frac{Z_s}{2} W_{A,A} \quad (1.19)$$

onde,  $Z_s$  representa o número de vizinhos próximos para uma molécula na superfície. Devido ao facto de  $W_{A,A}$  ser negativo e  $Z_b > Z_s$ , a movimentação da molécula a partir do seio da solução para a superfície corresponde, a pressão e temperatura constante, uma variação de energia de Gibbs positiva, ou seja, é necessário existir trabalho para criar nova superfície. Este trabalho pode ser definido como:

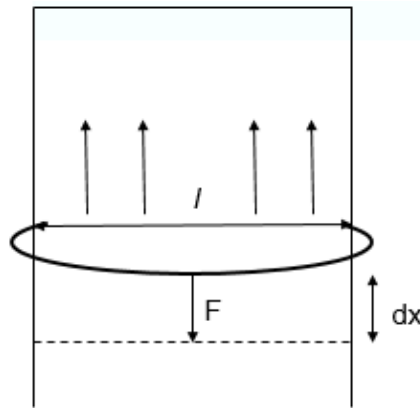
$$dw = \gamma dA \quad (1.20)$$

onde  $\gamma$  corresponde à tensão superficial e representa uma variação de energia de Gibbs por unidade de área, a pressão e temperatura constante.

A tensão superficial pode ser abordada de um ponto de vista mecânico, como se mostra na Figura 1.20, onde se considera uma armação metálica, constituída por um arame dobrado em U com um segundo arame que desliza sobre o anterior como um êmbolo. A armação metálica se mergulhada num líquido dá origem a um fino filme e de modo a garantir que esse filme não colapsa é necessário aplicar uma força no êmbolo

até atingir um equilíbrio. A necessidade de se aplicar uma força  $F$  para manter o arame em equilíbrio indica que existem outras forças com sentido oposto a atuar sobre este. Tendo em conta as forças exercidas pela interface e o comprimento do arame em forma de êmbolo, pode-se escrever a seguinte expressão:

$$\gamma = \frac{F}{2l} \quad (1.21)$$



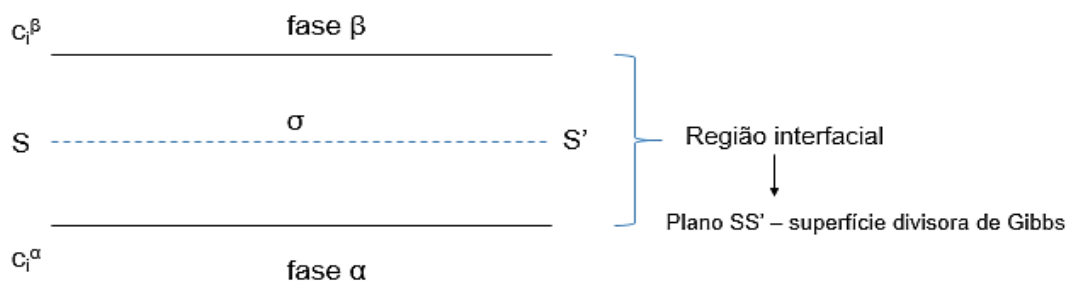
**Figura 1.20** – Armação metálica constituída por um arame dobrado em U com um segundo arame que desliza sobre o anterior como um êmbolo.

Como referido anteriormente, de um ponto de vista termodinâmico, e mantendo constante o valor da pressão e da temperatura, a tensão superficial traduz a variação da energia de Gibbs por unidade de área:

$$\gamma = \left( \frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,p} \quad (1.22)$$

O modelo de Gibbs proporciona um método útil para a análise do fenómeno de tensão superficial, tomando em conta a divisão do sistema em três parcelas: os volumes das fases de solução  $V^\alpha$  e  $V^\beta$  e a superfície que os separa (Figura 1.21).<sup>12, 30</sup>

**Figura 1.21** – Adsorção em interfaces líquido-gás: modelo de Gibbs.



Considerando um componente  $i$  distribuído pelas fases  $\alpha$  e  $\beta$  e sabendo que  $n_i^\alpha = c_i^\alpha V^\alpha$  e  $n_i^\beta = c_i^\beta V^\beta$ , a quantidade de componente  $i$  na interface é dada pela expressão:

$$n_i^\sigma = n_i - (n_i^\alpha + n_i^\beta) \quad (1.23)$$

onde  $n_i$  é a quantidade de substância do componente  $i$  e  $n_i^\alpha$  e  $n_i^\beta$  correspondem à quantidade do componente  $i$  que existe na fase  $\alpha$  e  $\beta$ , respetivamente.

Utilizando a expressão anterior, é possível definir a concentração superficial de excesso, ou simplesmente excesso superficial, para o componente  $i$  como:

$$\Gamma_i^\sigma = \frac{n_i^\sigma}{A} \quad (1.24)$$

onde  $A$  representa a área da interface de separação das fases e  $\Gamma_i^\sigma$  o excesso superficial, que pode tomar valores positivos, negativos ou nulos dependendo do comportamento do componente  $i$ .<sup>12</sup>

Aplicando-se a primeira lei da Termodinâmica à superfície, para um processo reversível, tem-se que:

$$dU = TdS - pdV \quad (1.25)$$

Relacionando a expressão 1.20 com a expressão 1.25, obtém-se a variação do trabalho total:

$$dw = \gamma dA - pdV \quad (1.26)$$

Assumindo que durante o processo de expansão da superfície não existe variação de volume, a equação da variação da energia interna da superfície pode ser reescrita:

$$dU^\sigma = TdS^\sigma + \gamma dA \quad (1.27)$$

Sendo um sistema constituído por mais que uma fase, existe uma variação da quantidade de substância entre as diferentes fases. Assim sendo, a expressão de

energia é reescrita de modo a incluir os potenciais químicos dos componentes do sistema, em ambas as fases:

$$\mu_i^\sigma = \mu_i^\beta = \mu_i^\alpha \quad (1.28)$$

logo, a variação da energia interna para a superfície é dada por:

$$dU^\sigma = TdS^\sigma + \gamma dA^\sigma + \sum_i \mu_i dn_i^\sigma \quad (1.29)$$

A expressão termodinâmica da energia interna para a superfície é:

$$U^\sigma = TS^\sigma + \gamma A + \sum_i n_i^\sigma \mu_i \quad (1.30)$$

Quando se compara a equação 1.29 com a equação 1.30, obtém-se a equação de adsorção de Gibbs:

$$S^\sigma dT + A d\gamma + \sum_i n_i^\sigma d\mu_i \quad (1.31)$$

A temperatura e pressão constante, a expressão anterior transforma-se na isotérmica de adsorção de Gibbs:

$$-d\gamma = \sum_i \Gamma_i d\mu_i \quad (1.32)$$

Esta expressão relaciona a mudança na tensão superficial,  $d\gamma_i$ , com variações no potencial químico,  $d\mu_i$ , através do excesso superficial. Considerando-se uma interface entre uma fase gasosa e uma solução binária, a equação 1.32 reduz-se:

$$-d\gamma = (\Gamma_1 d\mu_1 + \Gamma_2 d\mu_2) \quad (1.33)$$

onde 1 e 2 representam os constituintes da solução binária (tensioativo e solvente). Uma vez que a superfície de separação é arbitrária, é possível escolher a posição em que o excesso superficial do solvente (por exemplo, água) é igual a zero. Assim, a expressão simplifica-se para:

$$-d\gamma = -\Gamma_2 d\mu_2 \quad (1.34)$$

Assumindo que o potencial químico pode ser expresso em termos de concentração  $c_2$  do soluto,  $\mu_2 = \mu_2^\theta + RT \ln c_2$  e a temperatura constante  $d\mu_2 = RT d \ln c_2$ , obtém-se a isotérmica de adsorção de Gibbs reescrita:

$$\Gamma_2 = -\frac{1}{RT} \left( \frac{\partial \gamma}{\partial \ln(c)} \right) \quad (1.35)$$

A partir da isotérmica de adsorção de Gibbs<sup>31</sup> é possível calcular o excesso superficial do tensioativo, à custa da variação da tensão superficial e do valor do logaritmo neperiano da concentração imediatamente antes da *cmc*, de modo a garantir que a variação é linear.

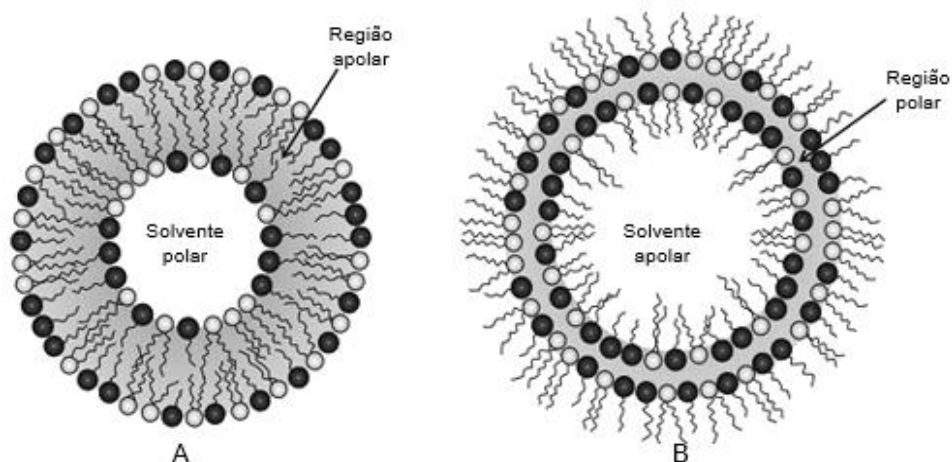
A área ocupada por uma molécula na superfície pode ser obtida através da equação de excesso superficial. Uma vez que excesso superficial indica a quantidade de moléculas por unidade de área, o seu inverso fornece a área por molécula na superfície:

$$a_s = \frac{1}{N_A \Gamma_1} \quad (1.36)$$

### 1.3. Lipossomas

Como referido anteriormente, os tensioativos e moléculas anfífilas relacionadas, de cadeia simples, agregam-se em micelas a baixa concentração. Por outro lado, os lípidos polares e outras moléculas de dupla cadeia hidrocarbonada formam usualmente estruturas em bicamadas para a maior parte do seu diagrama de fase binário e em soluções diluídas formam lipossomas ou vesículas.<sup>32-40</sup> A maioria das vezes, os termos lipossoma e vesículo são usados indistintamente, devido à relação de natureza histórica entre lipossomas e a sua composição em lípidos.<sup>32</sup> Neste trabalho, passaremos a usar a designação lipossoma.

Os lipossomas, usualmente de forma esférica, podem ser definidos como estruturas de bicamada fechada com uma cavidade interna que isola um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo. Os lipossomas podem ser formados em solventes polares, usualmente em solução aquosa, mas também em solventes apolares, apresentando-se sob a forma de lipossomas de fase reversa (Figura 1.22).



**Figura 1.22** – Representação esquemática de um corte de secção transversal de (A) – normal e (B) – lipossoma reverso, em solvente polar e solvente apolar. Adaptada de <sup>33</sup>

As bicamadas planares estendidas são uma forma termodinamicamente favorável para a associação de alguns tensioativos com grupos hidrofóbicos volumosos em solução aquosa, mas existem outras condições onde é mais favorável a formação de sistemas de bicamada fechada. Tal fato pode ser visto por dois prismas. As bicamadas polares extensas possuem limites ao longo dos quais as cadeias hidrocarbonadas podem ser expostas a um ambiente aquoso, resultando daí uma situação energética desfavorável. Por outro lado, é desfavorável do ponto de vista entrópico. A formação de lipossomas contorna estas duas situações uma vez que a formação de um sistema fechado remove o problema de exposição dos grupos hidrofóbicos à água e a formação de inúmeras estruturas de tamanho finito aumenta significativamente a entropia.<sup>34</sup>

Um parâmetro físico utilizado para caraterizar os lipossomas é a temperatura de transição gel – cristal líquido,  $T_m$ .<sup>35</sup> Abaixo desta temperatura, as cadeias hidrofóbicas encontram-se numa fase de gel e adotam uma configuração trans. Acima do valor de  $T_m$ , na fase cristal líquido, as cadeias do tensioativo têm elevada desordem conformacional.

Os lipossomas podem ser estruturalmente diferentes acima e abaixo da  $T_m$ . Normalmente, os lipossomas são esféricos, mas abaixo da temperatura de transição gel-cristal líquido podem sofrer alterações de forma devido ao modo como as cadeias hidrofóbicas cristalizam. Assim, lipossomas em forma de poliedros regulares, de discos, irregularmente facetados e tubulares têm sido reportados.<sup>33, 36-39</sup>

As soluções vesiculares apresentam um certo grau de polidispersão, isto é, uma distribuição de tamanho dos agregados. Os lipossomas unilamelares ultra pequenos possuem um raio médio da ordem de 5-10 nm, enquanto que os lipossomas gigantes

são maiores do que normalmente 250 nm. Os lipossomas multilamelares são constituídos por bicamadas concêntricas alternadas de tensioativo e água<sup>4</sup> e podem ter tamanhos de algumas centenas de nanómetros a algumas dezenas de micrómetros. Um exemplo de lipossomas multilamelares gigantes é encontrado na chamada ‘fase de cebola’.<sup>21</sup> A classificação dos lipossomas de acordo com os seus raios e número de bicamadas é apresentado na tabela 1.4.

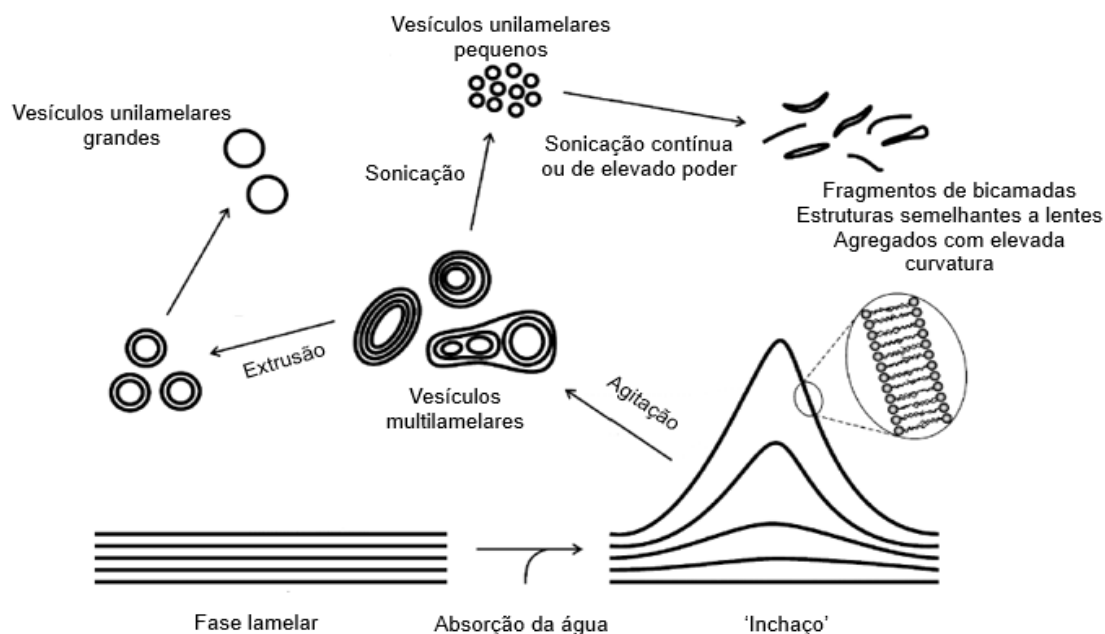
**Tabela 1.4** – Classificação dos lipossomas de acordo com o seu raio e número de bicamadas

Tipo de lipossoma	Notação	Variação do raio
Lipossomas unilamelares ultra pequenos	USUV	5 – 10 nm
Lipossomas unilamelares pequenos	SUV	10 – 50 nm
Lipossomas unilamelares grandes	LUV	50 – 250 nm
Lipossomas unilamelares gigantes	GUV	>250 nm
Lipossomas multilamelares	MLV	Centenas de nm a alguns $\mu\text{m}$

### 1.3.1. Métodos de formação: lipossomas espontâneos versus não – espontâneos

Os lipossomas podem ser classificados segundo a sua formação como não-espontâneos e espontâneos.<sup>32</sup> A formação não espontânea de lipossomas é obtida através de métodos que envolvem muita energia, formando-se agregados apenas cineticamente estáveis, ou seja, eles residem num estado de maior energia de Gibbs e, assim, são termodinamicamente instáveis.<sup>40</sup> A formação não espontânea de lipossomas pode ser por via mecânica ou via química. Os métodos mecânicos envolvem a fragmentação das estruturas em bicamada, utilizando intensas forças de cisão como por exemplo, através de agitação vigorosa, extrusão e sonicação.<sup>12</sup> A Figura 1.23 evidencia os processos de formação não- espontânea de lipossomas, bem como a relação com a fase lamelar líquido-cristalina que os originou.





**Figura 1.2.3** – Processos mecânicos não-espontâneos que conduzem à formação de lipossomas. Adaptado de <sup>40</sup>

A formação de lipossomas por via química, proporciona a quebra da simetria plana da bicamada, mudando-se a sua curvatura média para um valor positivo, e alterando-se assim a composição da camada. Isto pode ser obtido por exemplo, através da mudança da força iónica ou por adição de uma molécula adsorvida ou incorporada na monocamada externa do lipossoma.

Por outro lado, as fracas forças de cisão de bicamadas, flutuações térmicas ou assimetria de composição entre monocamada externa e interna são os principais fatores que promovem a formação de lipossomas espontâneos. Estes apresentam muitas vezes estabilidade a longo prazo e podem até ser considerados verdadeiras estruturas em equilíbrio termodinâmico.<sup>40</sup>

### 1.3.2. Aplicações dos lipossomas

Existem inúmeras aplicações práticas de lipossomas, desde o seu uso como suplementos nutricionais para alimentos<sup>41</sup> e em formulações para cosméticos, para agentes de compactação e descompactação de biomoléculas (DNA, proteínas, péptidos)<sup>42</sup>, como microreatores químicos<sup>43</sup>, na veiculação de genes (terapia génica não viral)<sup>44, 45</sup>, na veiculação controlada e direcionada de fármacos<sup>46-48</sup>, e ainda para a formação de sistemas lipossoma-polímero de interesse reológico<sup>33, 36</sup>.

No que respeita à aplicação dos lipossomas a nível terapêutico, que tem sido expandida consideravelmente nas últimas três décadas, verifica-se a possibilidade de

utilizar os lipossomas para entrega controlada de fármacos com elevado grau de toxicidade, como é o caso de fármacos utilizados em tratamentos oncológicos, dermatológicos, anti-microbianos e respiratórios. Existem estudos associados à preparação de lipossomas com hemoglobina encapsulada (LEH)<sup>49</sup>, os quais mimetizariam assim a estrutura dos glóbulos vermelhos do sangue, e transportariam oxigénio por todo o organismo, bem como estudos associados ao tratamento da síndrome de imunodeficiência.<sup>50, 51</sup>

Uma das grandes vantagens associadas aos lipossomas é o fato da estrutura vesicular apresentar semelhanças com a estrutura da membrana celular, tornando a interação com as células e tecidos do organismo mais eficiente. O uso de lipossomas permite a veiculação do princípio ativo até ao local a tratar e promove a libertação controlada e localizada do fármaco, tornando possível a administração em doses superiores do fármaco e evitando efeitos secundários observados.

### 1.3.3. Lipossomas cataniónicos e âmbito deste trabalho

As misturas cataniónicas são misturas aquosas pseudo-ternárias de tensioativos de carga oposta, obtidas para diferentes razões de mistura catiónico-aniónico.<sup>52</sup> Devido ao forte carácter associativo e não ideal, as propriedades das misturas cataniónicas diferenciam-se consideravelmente das apresentadas pelos tensioativos individuais.

As misturas cataniónicas possuem importantes fenómenos interfaciais sinérgicos, devido à atração eletrostática entre os grupos polares de carga oposta e da interação hidrofóbica entre as cadeias hidrocarbonadas dos tensioativos presentes no sistema cataniónico. O forte carácter sinérgico conduz a atividade superficial melhorada, adsorção nas interfaces, detergência<sup>53</sup> e decréscimo do valor da concentração micelar crítica.<sup>54, 55</sup>

Os parâmetros mais importantes que afetam o comportamento de fase destas misturas são o parâmetro crítico de empacotamento dos tensioativos individuais, a concentração total de tensioativo, a razão molar de mistura e a adição de sal. A variação da razão entre as moléculas anfífilas iónicas torna possível o ajuste da carga dos agregados e do parâmetro de empacotamento efetivo da mistura, podendo originar-se uma larga diversidade de agregados e fases.

Pode estabelecer-se uma distinção entre sistemas cataniónicos diluídos e sistemas cataniónicos concentrados. Nos primeiros, pode ocorrer crescimento micelar e a formação de agregados vesiculares estáveis bem como fenómenos de separação de fase. A elevadas concentrações, uma variedade de fases líquido- cristalinas mistas

podem ser formadas, algumas das quais inteiramente distintas das formadas pelo sistema binário tensioativo-água.<sup>17</sup>

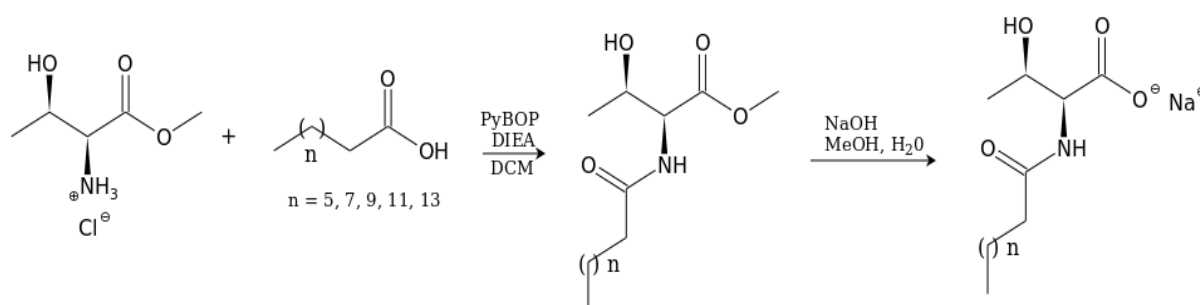
Na última década e meia, este tipo de misturas têm vindo a gerar um interesse crescente, devido à formação espontânea de lipossomas estáveis para baixa concentração de tensioativos.<sup>56</sup> Os lipossomas cataniónicos, com o objetivo de serem utilizados em áreas como medicina, biologia e farmacologia, têm assim permanecido sob extensa e dinâmica investigação. Numa primeira fase, surgiram estudos fundamentais de misturas cataniónicas baseadas em tensioativos comercialmente disponíveis, mas com elevado grau de toxicidade e baixa biocompatibilidade para possíveis aplicações biomédicas. Este tipo de lipossomas cataniónicos tem elevado interesse fundamental e tem aplicações para estudos de modelos membranares, para desenvolvimento de microreatores químicos, síntese de nanopartículas, catálise e separação cromatográfica, etc.

Porém, o uso de novos tensioativos biocompatíveis, em particular baseados em aminoácidos, abre novas possibilidades para as aplicações biomédicas de misturas cataniónicas. Assim, foi já reportada a formação de lipossomas cataniónicos espontâneos e de elevada estabilidade contendo derivados de lisina e serina<sup>57</sup>. Com este trabalho, pretendeu-se também contribuir para a pesquisa deste tipo de sistemas, estudando-se o comportamento de fase e a caracterização microestrutural de várias misturas de tensioativos catiónicos/aniónicos, contendo como tensioativo aniónico comum o derivado de treonina Na12Thr. Os sistemas cataniónicos envolveram misturas aquosas de Na12Thr com um tensioativo comercial comum, um tensioativo derivado de serina, geminis bis-quats de amónio quaternário, com diferente comprimento de espaçador, e geminis bis-quats derivados de serina.

## II Secção Experimental

### 2.1. Compostos utilizados

Os novos tensioativos monoméricos aniónicos derivados de treonina foram desenvolvidos, sintetizados e purificados por investigadores dos grupos de Química Orgânica e Química-Física da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, no âmbito de um projeto de colaboração científica. Para a obtenção dos novos compostos, foi seguido o plano de síntese apresentado na Figura 2.1.

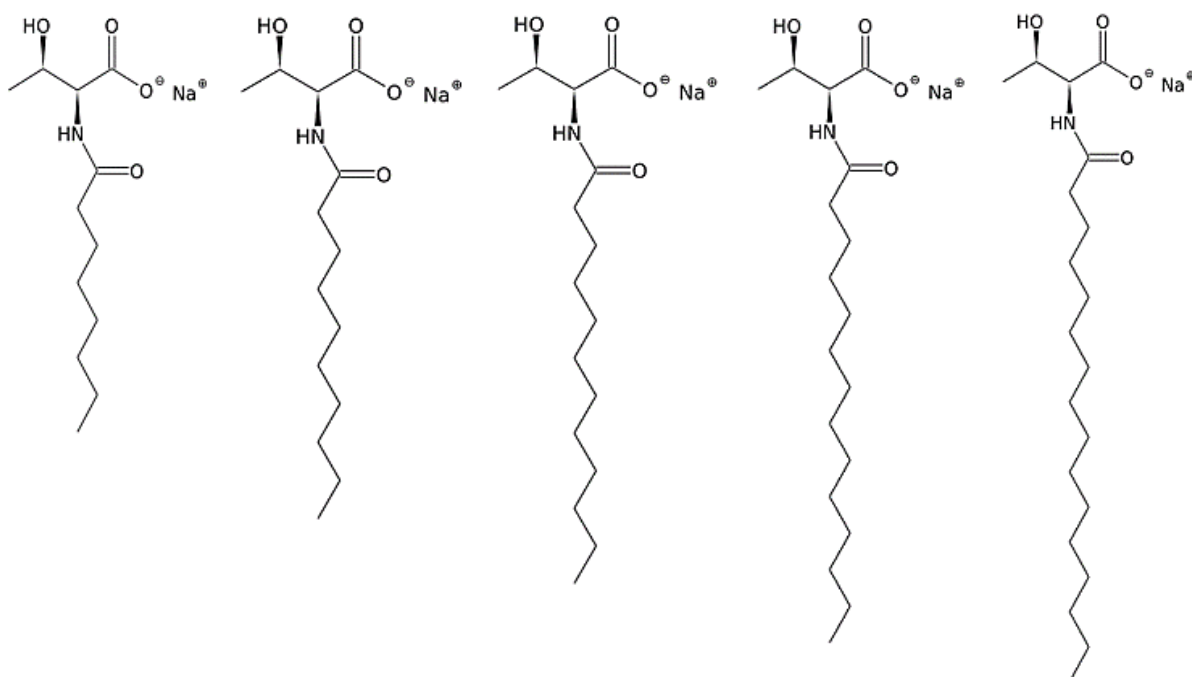


**Figura 2.1** – Esquema de síntese dos tensioativos aniónicos derivados de Treonina.

A síntese destes compostos foi subdividida em duas etapas. Primeiramente, foi realizada uma reação de condensação, com duração máxima de 48 horas, utilizando o agente condensador PyBOP, de modo a obter-se o composto amida. Após obtenção da amida, esta sofreu reacção de hidrólise básica, vulgarmente designada por saponificação, durante 48 horas, obtendo-se o composto pretendido.

Os novos compostos foram purificados por cromatografia em coluna e recristalização em  $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$  obtendo-se um sólido cristalino, branco e solto. Para avaliação do grau de pureza obtido foi realizada análise por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa de alta resolução.

A estrutura molecular dos tensiosativos derivados de treonina encontra-se apresentada na Figura 2.2.



**Figura 2.2** – Estruturas moleculares dos diferentes tensioativos derivados de treonina.

Na Tabela 2.1 estão descritos os nomes científicos e as abreviaturas usadas no decorrer do trabalho para os diferentes compostos, bem como as respetivas massas molares

**Tabela 2.1** – Compostos estudados e respetiva massa molar

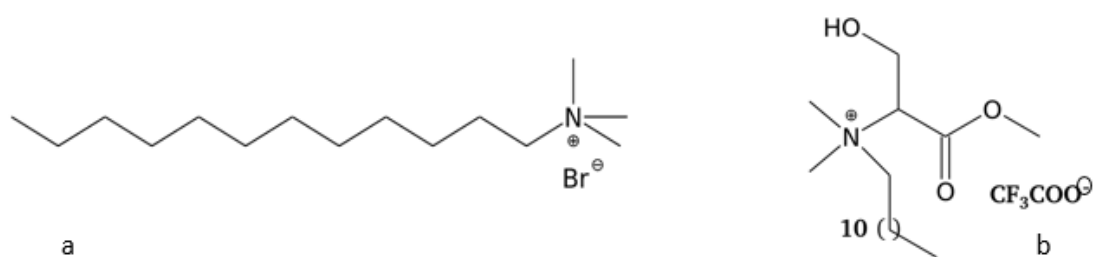
Tensioativo	Abreviatura	M/g.mol <sup>-1</sup>
<b><i>N</i>-octadecanoíltreoninato de sódio</b>	Na8Thr	267.30
<b><i>N</i>-decanoíltreoninato de sódio</b>	Na10Thr	295.35
<b><i>N</i>-dodecanoíltreoninato de sódio</b>	Na12Thr	323.40
<b><i>N</i>-tetradecanoíltreoninato de sódio</b>	Na14Thr	351.46
<b><i>N</i>-hexadecanoíltreoninato de sódio</b>	Na16Thr	379.51

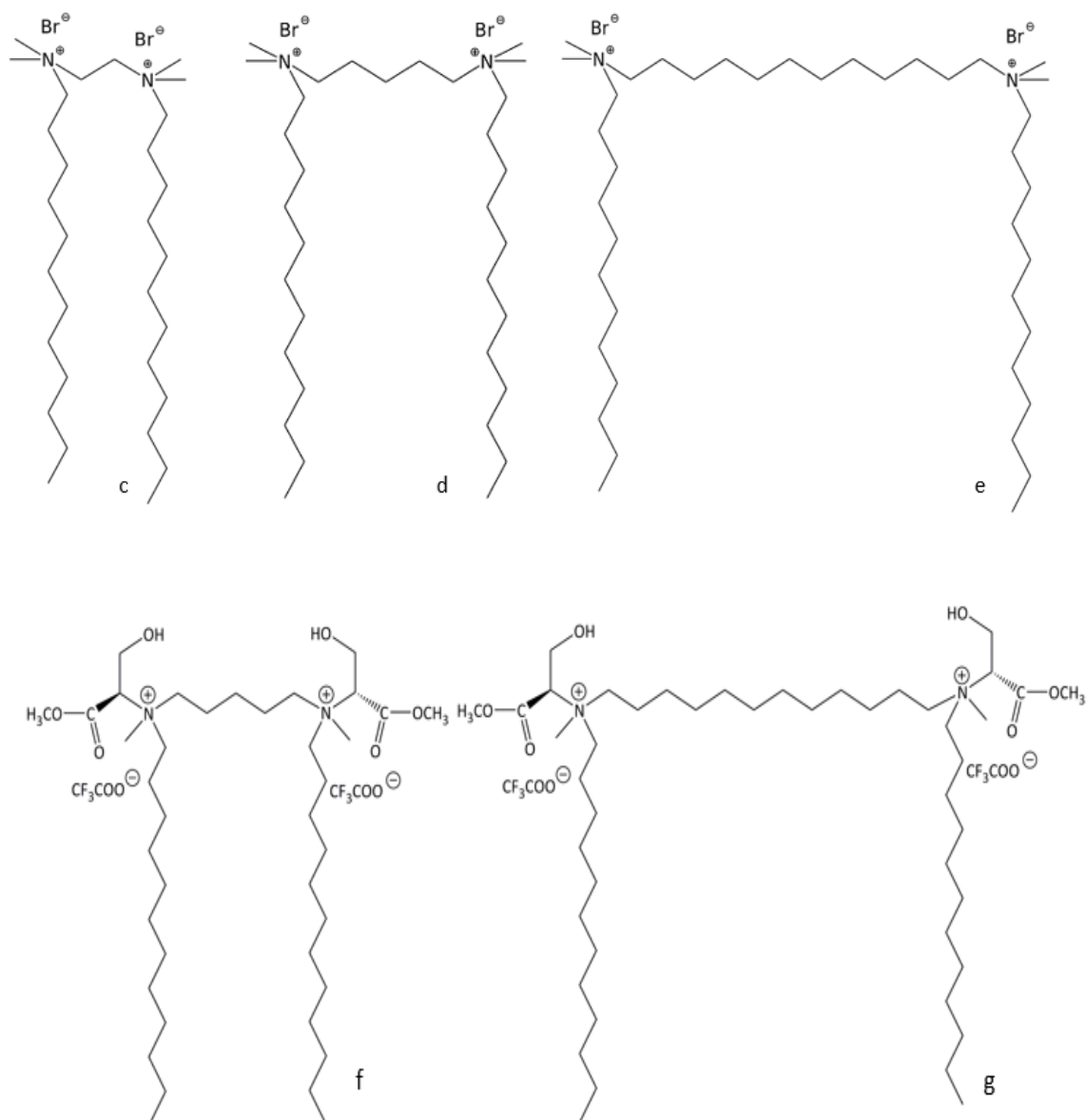
Para se proceder à realização de misturas catiónicas foram utilizados diferentes tipos de tensioativos catiónicos, descritos na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** – Tensioativos catiónicos utilizados neste trabalho

Tensioativo	Abreviatura	M/g.mol <sup>-1</sup>
Brometo de dodeciltrimetilamónio	DTAB	308.34
N-dodecadecil-N-(2-hidroxil-1-metoxycarbonil)etil-N-N-dimetilamónio trifluoroacetato	12SerTFAc	421.45
1,2-bis(dodecildimetilamónio)etano dibrometo	12-2-12	614.67
1,2-bis(dodecildimetilamónio)pentano dibrometo	12-5-12	656.76
1,2-bis(dodecildimetilamónio)dodecano dibromo	12-12-12	754.93
Pentametileno bis{(dodecil)[(2-hidroxi-1-metoxycarbonil)-etil(metil)amónio Bis(trifluoroacetato)]}	(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	899.12
Dodecametileno bis{(dodecil)[(2-hidroxi-1-metoxycarbonil)-etil(metil)amónio Bis(trifluoroacetato)]}	(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>12</sub>	997.30

A estrutura molecular dos tensioativos catiónicos encontra-se esquematizada na Figura 2.3.





**Figura 2.3** – Estruturas moleculares dos diferentes tensoativos catiónicos. a) DTAB; b) 12SerTFAc; c), d), e) geminis bis-quats 12-*n*-12; f) e g) geminis bis-quats derivados de serina (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>.

O tensoativo DTAB, obtido comercialmente pelo fabricante Sigma, apresenta-se com grau de pureza de 98%. Todos os restantes compostos foram sintetizados e purificados por investigadores do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, tal como descrito nos respetivos artigos publicados. Assim, foram sintetizados o tensoativo monomérico derivado de serina, 12SerTFAc<sup>19</sup>, os geminis convencionais diméricos 12-*n*-12 com espaçador de comprimento variável<sup>158-60</sup> e os geminis bis quats derivados de serina<sup>6</sup>. Todos estes compostos foram purificados e apresentam-se em elevado grau de pureza, de acordo com todos os estudos reportados (RMN, HRMS, DSC e tensão superficial).<sup>6,20,58-60</sup>

## 2.2. Preparação das amostras

As soluções utilizadas para estudos de tensiometria foram preparadas em material de vidro previamente imerso em ácido sulfúrico concentrado. Após lavagem com ácido, o material foi passado por acetona, álcool etílico e água desionizada repetidas vezes. As soluções de tensioativo utilizadas em tensiometria foram preparadas no dia de cada análise por pesagem do respetivo sólido e de água ultra-pura (sistema Millipore™), através de uma balança analítica com precisão de  $\pm 1 \times 10^{-5}$ . As concentrações de tensioativo são expressas em molalidade. No caso de se proceder ao ajuste de pH, usou-se solução de hidróxido de sódio 0.1000 mol.dm<sup>-3</sup>.

Para os estudos de comportamento fásico e observações microscópicas (ópticas e eletrónicas), as misturas cataniónicas foram preparadas por adição de volumes retirados de soluções-stock de cada tensioativo individual, de concentração expressa em molaridade.

A concentração de tensioativo em solução poderá ser expressa de diferentes formas, como descrito na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Formas de expressão de composição de amostras preparadas neste trabalho

Composição	Definição	Unidade
Molaridade	$c = \frac{n(\text{soluto})}{V_{\text{solução}} (\text{dm}^3)}$	mol.dm <sup>-3</sup>
Molalidade	$m = \frac{n(\text{soluto})}{m_{\text{solvente}}(\text{kg})}$	mol.kg <sup>-1</sup>
Percentagem mássica	$\%_{m/m} = \frac{m(\text{tensioativo}_i)}{m(\text{total})} \times 100$	%
Fração molar de tensioativo iónico na mistura cataniónica	$x^- = \frac{n^-}{n^- + n^+}$ $x^+ = \frac{n^+}{n^+ + n^-}$	---
Razão molar	$r^- = \frac{n^-}{n^+}$ $r^+ = \frac{n^+}{n^-}$	---



## 2.3. Tensiometria

Existem vários métodos para medição da tensão superficial de um líquido, métodos esses baseados na medição de diferentes propriedades físicas, tal como apresentado na Figura 2.4.

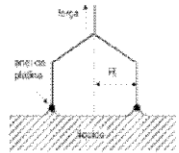
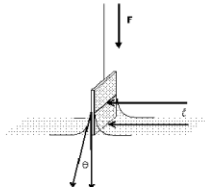
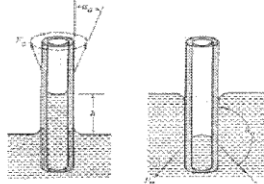
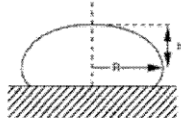
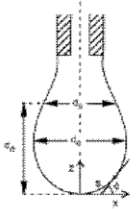
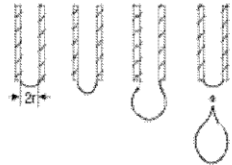
Método	Esquema Representativo	Base do Método	Características Gerais
<u>Anel Du Noüy</u>		Medição de Forças	Simples Manualmente moroso
<u>Placa de Wilhelmy</u>			Sem correções hidrostáticas Sem criação de nova superfície Alteração da molhabilidade por algumas soluções de tensoativo
<u>Ascensão e Depressão Capilar</u>		Medição de Pressão	Muito preciso para soluções puras que molhem a parede do capilar Necessário conhecimento rigoroso da densidade, raio do capilar e ângulo de contacto
<u>Gota Sésil</u>		Medição Geométrica	Muito vantajoso para altas temperaturas Permite estimar tensão superficial de sólidos
<u>Gota Pendente</u>			Tecnicamente simples Trabalhoso para atingir a forma correta da gota
<u>Gota Cadente</u>			Muito simples Baixa precisão Moroso

Figura 2.4 – Diferentes métodos para obtenção da tensão superficial.

No decorrer do trabalho foi utilizado o método da placa de Wilhelmy<sup>61, 62</sup>, considerado um método relativamente rápido e de elevada precisão e exatidão.

Quando se mergulha parcialmente um corpo sólido numa superfície líquida, a tensão superficial atua em todo o perímetro,  $L$ , do sólido molhado. A força resultante obtida pode ser calculada através da expressão:

$$R = \int_L \gamma dL \quad (2.1)$$

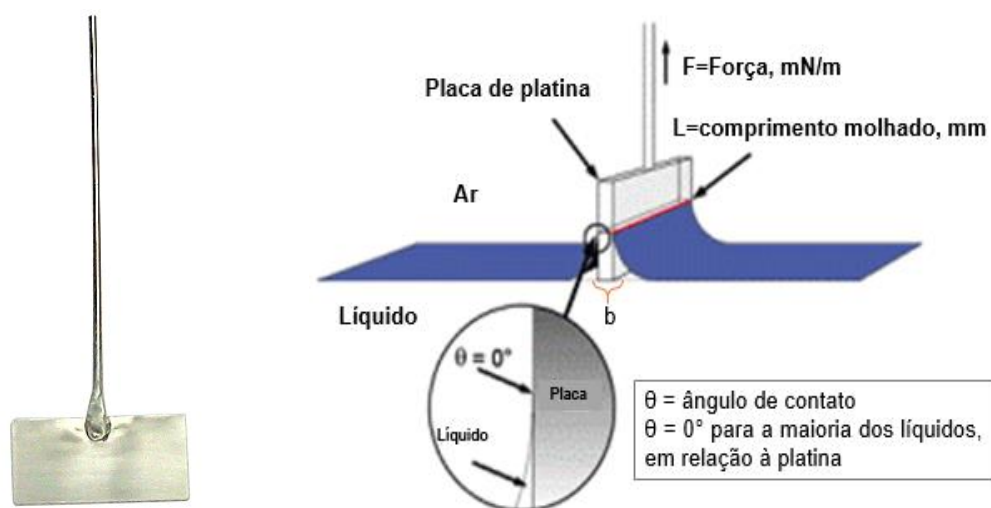
O método de Wilhelmy utiliza uma placa com superfície rugosa, constituída por platina ou por uma liga de platina-irídio, acoplada a uma balança. A placa de Wilhelmy (Figura 2.5a) apresenta uma elevada resistência a ataques químicos e possui boa estabilidade mecânica e térmica.

A tensão superficial manifesta-se no menisco formado à volta da placa. Se a balança for calibrada e posta a zero antes de mergulhar a placa no líquido, o aumento de massa registado é resultante do menisco formado no perímetro da placa. O peso do menisco é equivalente à força vertical proveniente da superfície. Esta força é igual à componente vertical da tensão superficial ( $\gamma \cos\theta$ , onde  $\theta$  é o ângulo de contacto) vezes o perímetro  $L$  da placa. Considerando o ângulo de contacto igual a zero, tem-se que a tensão superficial (força por unidade de comprimento) é dada por:

$$\gamma = \frac{m_{\text{menisco}} g}{L} \quad (2.2)$$

onde  $m_{\text{menisco}}$  representa a massa do menisco medida,  $g$  a aceleração da gravidade e  $L$  (comprimento da placa molhada) dado por:

$$L = 2(l + b) \quad (2.3)$$



**Figura 2.5** - a) Placa de Wilhelmy utilizada no decorrer do trabalho; b) Processo de medição da tensão superficial através do método da placa de Wilhelmy.

### 2.3.1. Procedimento experimental

A tensão superficial foi medida com um tensiómetro comercial Dataphysics modelo DCAT11, que tem acoplado o software SCAT11 (Figura 2.6). Este modelo permite a utilização do método da placa de Wilhelmy.

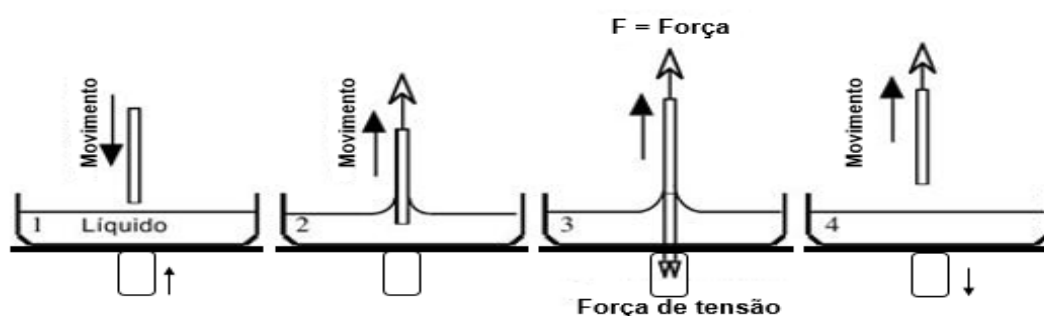


**Figura 2.6** – Tensiómetro DCAT11.

A medição da tensão superficial obedece genericamente a quatro etapas diferentes, como evidenciado na Figura 2.7.

A solução é colocada num vaso, cuidadosamente lavado e seco, assim como a placa de Wilhelmy, que para além de lavada é levada à chama. O vaso é elevado até à placa, por sua vez ligada a uma balança que mede o valor de massa do perímetro molhado da placa, automaticamente convertido em força. O software utilizado, SCAT11, possibilita a conversão de valores de massa em tensão superficial e o controlo de diversas variáveis, tais como a velocidade de subida do vaso, o perímetro de placa mergulhado e a temperatura.

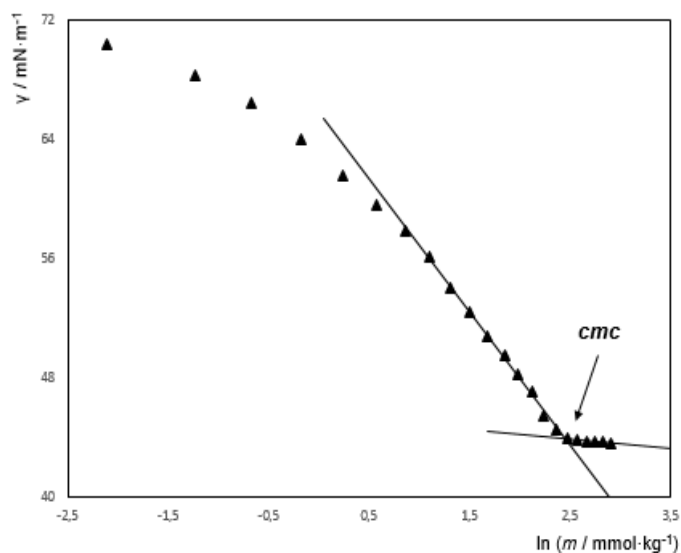
As medições de tensão superficial foram realizadas a diferentes temperaturas, dependendo do tensioativo e da correspondente temperatura de Krafft. No caso dos compostos Na8Thr, Na10Thr e Na12Thr as medições foram efetuadas a 25.0 °C. Para os compostos Na14Thr e Na16Thr, as temperaturas de medição foram de 40.0 °C e 60.0 °C, respetivamente.



**Figura 2.7** – Medição da tensão superficial pelo método da placa de Wilhelmy: 1) o vaso que contém a solução é elevado até entrar em contato com a parte inferior da placa; 2) a placa é imersa cerca de 3 mm, formando-se um menisco em torno da mesma; 3) a balança mede o valor de massa do perímetro da placa, convertido em força; 4) depois da medição, o vaso desce à posição inicial

### 2.3.2. Análise de dados

Após obtenção dos valores de tensão superficial para cada ponto de concentração conhecida, é possível a determinação da *cmc*. A *cmc* é obtida através da intersecção de dois ajustes obtidos por regressão linear, situados antes e após do ponto de inflexão da reta do gráfico da variação da tensão superficial com o logaritmo da concentração do tensioativo, como se pode visualizar na Figura 2.8.



**Figura 2.8** – Gráfico representativo da variação da tensão superficial com o logaritmo da concentração de tensioativo.

## 2.4. Microscopia

### 2.4.1. Microscopia de luz

A microscopia de luz é utilizada geralmente para a visualização de agregados tipicamente maiores que 500 nm, sendo necessária uma fonte de iluminação de luz visível com comprimento de onda compreendido entre os 400-750 nm. As imagens obtidas através de um microscópio são imagens ampliadas e invertidas, horizontalmente e verticalmente. Apesar de a ampliação poder ser aumentada sem nenhum fator limitante, para a resolução o mesmo pressuposto não é satisfeito.

A resolução é a capacidade de distinguir pontos adjacentes como objetos individuais, e é limitada pelo comprimento de onda da radiação utilizada para a visualização da amostra. A resolução de um microscópio de luz é dada pela expressão abaixo:<sup>63</sup>

$$R = \frac{\lambda}{2 N.A.} \quad (2.4)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz e  $N.A$  é a abertura numérica da objetiva, que pode ser obtida pela expressão:

$$N.A = n \sin \mu \quad (2.5)$$

onde  $n$  corresponde ao índice de refração do meio entre a lente e a amostra e  $\mu$  representa metade do ângulo de abertura da objetiva. O ângulo de abertura da objetiva está relacionado com a quantidade de luz que a lente é capaz de recolher após a radiação atravessar a amostra e sofrer difração. Para além do poder de resolução ser limitado pelo comprimento de onda da radiação visível, como visto anteriormente, também sofre influência por parte da difração da luz pela amostra. Um microscópio de luz apresenta um limite teórico da resolução de cerca de 200-250 nm.<sup>63</sup>

#### 2.4.2. Microscopia de luz polarizada

Quando se pretende estudar a birrefringência ou atividade ótica de materiais, é necessária a utilização de luz polarizada. Uma amostra é birrefringente se, devido à existência de domínios com índices de refração diferentes, ela for capaz de interferir seletivamente com a propagação da luz polarizada, de acordo com a direção de propagação da radiação incidente. A polarização da luz no microscópio é conseguida colocando-se um filtro polarizador a seguir à fonte de luz; apenas as ondas que vibram paralelamente ao eixo de transmissão do polarizador são capazes de atravessar o filtro.

Quando a luz polarizada é propagada num meio anisotrópico, o plano vibracional é alterado e as ondas deixam de vibrar paralelamente. Colocando-se um segundo polarizador entre a ocular e a amostra, de modo que o eixo de transmissão esteja num ângulo de 90° relativamente ao primeiro polarizador (polarizadores cruzados), a única radiação capaz de atravessar o segundo polarizador e a chegar à ocular será aquela que terá sofrido polarização pela amostra.<sup>64</sup>

As amostras anisotrópicas provocam a mudança de vibração do plano da luz, devido à existência de diferentes índices de refração no mesmo material. Quando a luz incide no material, é refratada em dois raios que seguem direções perpendiculares a diferente velocidade, sendo este fenómeno designado por birrefringência. O índice de refração é obtido por:<sup>65</sup>

$$n = \frac{c}{c'} \quad (2.4)$$

onde  $c$  é a velocidade de propagação da luz no vácuo e  $c'$  é a velocidade de propagação da luz num dado meio. O valor de  $c'$  está relacionado com o meio em causa através da expressão:<sup>64</sup>

$$c' = \frac{c}{\sqrt{\epsilon \mu}} \quad (2.5)$$

onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio e  $\mu$  é a permeabilidade magnética da amostra. Como os sistemas estudados são materiais não magnéticos,  $\mu \approx 1$ , e a expressão 2.4 é simplificada:

$$n = \sqrt{\epsilon} \quad (2.6)$$

Se uma amostra possui anisotropia estrutural, regiões diferentes terão diferentes valores diferentes de índices de refração como consequência das diferentes constantes dielétricas observadas em diferentes direções. Isto ocorre em fases líquido-cristalinas anisotrópicas formadas por tensioativos (por ex. fases hexagonais e lamelares), em lipossomas e túbulos multilamelares e em fases cristalinas anisotrópicas.

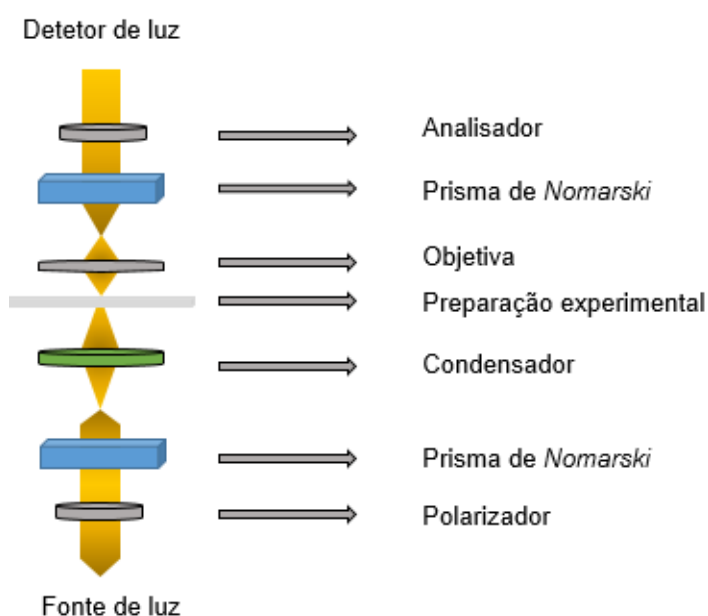
### 2.4.3. Contraste por Interferência Diferencial

A técnica por contraste por interferência diferencial (DIC, *differential interference contrast*), também conhecida como contraste de interferência de *Nomarski*, é uma outra aplicação de luz polarizada em microscopia de luz. Na presente técnica, a luz polarizada é ainda tratada de modo a realçar o fino contraste entre as regiões da amostra que têm composição diferente, diferentes espessuras ou índices de refração semelhantes.<sup>63</sup>

Esta técnica tem como modo de funcionamento a separação da luz polarizada em dois feixes, que vibram perpendicularmente um em relação ao outro. A separação é alcançada pelo prisma de *Nomarski*, localizado entre o polarizador e o condensador. Os dois feixes obtidos vibram entre si com um ângulo de  $90^\circ$  e por este motivo as suas ondas não sofrem interferências. Os componentes perpendiculares da onda dividida atravessam a amostra em diferentes regiões, devido ao facto dos feixes se propagarem com uma pequena diferença de caminho. Assim, os dois feixes experimentam diferentes condições de propagação (índice de refração, espessura da amostra) que se irão refletir na sua transmissão.

Um segundo prisma de *Nomarski* é colocado imediatamente depois das objetivas e tem como função combinar novamente as ondas divididas. Assim, os dois feixes que se propagam perpendicularmente entre si vão sofrer interferência, o que resulta num aumento de contraste. Para além do contraste, esta técnica fornece uma aparência tridimensional aos agregados, correspondente à variação de densidade ótica da amostra.

A representação esquemática de um microscópio utilizando um sistema de iluminação DIC, encontra-se na Figura 2.9.



**Figura 2.9** – Representação esquemática de um microscópio equipado com sistema de iluminação de contraste por interferência diferencial (DIC).

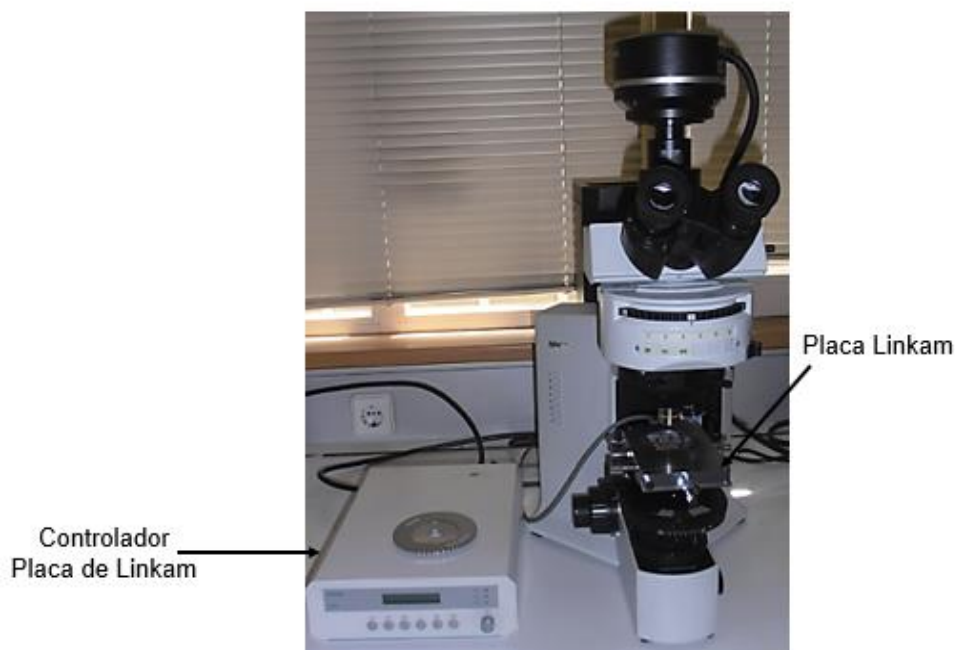
#### 2.4.4. Procedimento experimental

Neste trabalho, as amostras foram visualizadas através de um microscópio de luz polarizada Olympus BX51 (Figura 2.10), equipado com contraste por interferência diferencial (DIC). As imagens das várias amostras foram captadas por uma câmara digital Olympus C5060, acoplada ao microscópio. Para as observações que requerem variação de temperatura utilizou-se uma placa de Linkam THMS600.

Como referido anteriormente, as amostras utilizadas foram preparadas por adições de diferentes volumes de tensioativo com a mesma concentração de solução stock. Prepararam-se amostras com concentração compreendidas entre 0.10 e 10% m/m. As visualizações foram feitas pelo método lâmina-lamela: colocou-se uma gota de



solução no centro da lâmina, cobriu-se com uma lamela e selou-se a lâmina à lamela, de modo a obter imagens com melhor resolução, contraste e nitidez.



**Figura 2.10** – Microscópio ótico ligado ao controlador de temperatura da placa de Linkam.

#### 2.4.5. Microscopia eletrónica

A caracterização visual da estrutura e morfologia de agregados com tamanho inferior ao de limite de deteção do microscópio ótico pode ser efetuada por meio de microscopia eletrónica.<sup>66,67</sup> Esta técnica microscópica utiliza feixes de eletrões para visualizar as amostras, o que é uma vantagem em relação à microscopia ótica pois supera a limitação do comprimento de onda da luz visível.

Em microscopia eletrónica o feixe de eletrões é gerado quer por efeito termoiónico ou por emissão de campo sob condições de elevado vácuo. Devido às condições de alto vácuo, pressões ultra-baixas, as amostras em solvente necessitam de ser secas ou vitrificadas, sendo que no processo de vitrificação deve-se evitar a deterioração da amostra por formação de cristais de gelo.<sup>66,67</sup>

Este tipo de microscopia pode ser operado em dois modos distintos: microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

#### 2.4.6. Microscopia eletrónica de varrimento criogénica (cryo-SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento criogénica (*cryo-SEM*) é uma excelente técnica para imagem da microestrutura de agregados coloidais tipicamente maiores do que 0.1  $\mu\text{m}$ , formados em soluções ou dispersões viscosas e concentradas.<sup>66</sup> Em *cryo-SEM*, a amostra que se encontra no estado sólido é varrida sequencialmente por um feixe de eletrões. Esse varrimento faz com que a superfície emita diferentes sinais, pelo que o acoplamento de todos esses sinais permite o estudo da superfície. É de salientar que esta técnica possibilita, em princípio, a visualização da morfologia das amostras no seu estado natural, sem que ocorra alteração estrutural.

A microscopia eletrónica de varrimento para além de ter uma elevada profundidade de campo, possui elevada resolução na visualização da estrutura e permite observar a topografia, número atómico, composição elementar, estrutura cristalina, e as propriedades magnéticas e elétricas da amostra.<sup>64, 67</sup>

O procedimento técnico do *cryo-SEM* fundamenta-se na vitrificação, através de azoto ou propano líquido, das soluções, a pressão elevada, e posterior fratura, efetuada numa câmara de vácuo a temperaturas muito baixas (entre -110 e 140°C). Com a fratura é criada uma região de relevo na amostra, a qual é depois liofilizada por um dado período de tempo a uma temperatura entre 110 e 140 °C. Posteriormente, a amostra é revestida por um material condutor (ouro, paládio ou platina, por exemplo) num procedimento denominado de *sputtering*. Por fim, procede-se à sublimação parcial do solvente da amostra, de modo a revelar o seu interior e a microestrutura presente.

#### 2.4.7 Preparação de amostras

As experiências de *cryo-SEM* foram realizadas no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP). O microscópio eletrónico utilizado foi o JEOL JSM 6301F Oxford INCA Energy 350 equipado com uma câmara de crio-preparação Gatan Alto 2500. A amostra foi rapidamente arrefecida, mergulhando-a em azoto líquido sub-arrefecido e transferida, em vácuo, para a câmara de preparação com a platina arrefecida. A vitrificação foi efetuada em azoto a -200 °C. A amostra foi depois fraturada e sofreu posterior sublimação do solvente (água) a -90°C durante 2 minutos. Após este procedimento, revestiu-se a amostra por uma liga de ouro/paládio, por pulverização iónica, durante 35 segundos numa atmosfera de árgon. A observação foi efetuada a uma temperatura de -150°C.

## 2.5. Dispersão dinâmica de luz

A dispersão dinâmica de luz, (dynamic light scattering, DLS), também conhecida por espectroscopia de correlação fotónica é uma das principais técnicas usadas para determinação *in situ* do tamanho, da distribuição de tamanho médio, e em alguns casos, da forma de partículas em solução.<sup>68 69, 70</sup>

A incidência de um feixe de luz monocromática, como por exemplo, um laser, numa solução com partículas esféricas com movimento browniano, provoca um deslocamento Doppler quando a luz atinge as partículas em movimento, alterando-se o comprimento de onda relativamente ao da luz incidente. Esta alteração está relacionada com o tamanho da partícula. É assim possível obter a descrição da distribuição de tamanhos da partícula no meio, medindo-se o coeficiente de auto-difusão da partícula e utilizando a função de autocorrelação.

Os fundamentos físicos desta técnica assentam em dois pressupostos.<sup>68-70</sup>

1) Assume-se que as partículas estão em movimento browniano e nesta situação conhece-se a função densidade de probabilidade, dada através de:

$$P(r, t|0,0) = (4\pi Dt)^{-3/2} e^{\left(\frac{-r^2}{4Dt}\right)} \quad (2.7)$$

onde  $D$  é o coeficiente de auto-difusão da partícula.

2) O segundo pressuposto baseia-se no fato de que as partículas são esféricas e é possível aplicar a equação de Stokes – Einstein, obtendo-se o coeficiente de difusão através da equação:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (2.8)$$

onde  $R_H$  é o raio hidrodinâmico da esfera,  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\eta$  a viscosidade do solvente. Esta equação evidencia que a velocidade de difusão de uma dada partícula é igual à velocidade da esfera com raio  $R_H$ , sem qualquer informação específica sobre a forma da partícula. Uma vez que a partir da dispersão da luz é possível obter informação sobre o posicionamento das partículas, através das expressões 2.7 e 2.8, a obtenção do raio das partículas é facilitado.

### 2.5.1. Procedimento experimental

As soluções aquosas de tensioativo a diferentes concentrações foram analisadas pelo analisador de partículas Malvern ZetaSizer Nano ZS. Para determinação do tamanho das partículas, frequências populacionais e respetivos erros, alíquotas de 1 ml de cada solução catiónica em estudo, foram colocadas em cuvetes de poliestireno descartáveis, e analisadas à temperatura de 25 °C.

O potencial zeta foi estimado a partir da velocidade das moléculas em solução, onde as amostras foram colocadas em células capilares descartáveis de policarbonato contendo elétrodos revestidos a ouro. As amostras antes de serem analisadas equilibraram cerca de 120 segundos e foram realizadas cinco repetições para cada amostra, para obtenção final de um valor médio de cada parâmetro em estudo.

## III Resultados e Discussão

### 3.1. Propriedades interfaciais dos tensioativos derivados de treonina

De modo a estudar-se as propriedades de solução dos novos tensioativos derivados de treonina, realizaram-se experiências de tensiometria. Foram assim obtidas as curvas de variação da tensão superficial em função da concentração molal de tensioativo em solução, e a partir das curvas determinou-se o valor da concentração micelar crítica. As medições de tensão superficial foram realizadas a 25.0 °C, exceto para os compostos Na14Thr e Na16Thr, efetuadas a 40.0 °C e 60.0 °C, respetivamente, uma vez que estes tensioativos são insolúveis abaixo destas temperaturas. Devido ao facto dos compostos possuírem um grupo polar carboxilato e serem assim protonáveis, a obtenção da *cmc* foi efetuada com e sem ajuste do pH das soluções, como se descreverá adiante.

Tal como já referido na Introdução, o excesso superficial máximo pode ser calculado através da expressão:

$$\Gamma_{\max} = \frac{1}{nRT} \left[ \frac{\partial \gamma}{\partial \ln(m/m^0)} \right]_{p,T} \quad (1.35)$$

onde  $R$  é a constante de gases ideais,  $T$  a temperatura absoluta,  $N_A$  a constante de Avogadro, e  $\partial \gamma / \partial \ln(m/m^0)$  corresponde ao declive máximo (em módulo) de uma reta ajustada por regressão linear aos pontos da curva situados a concentração inferior à do ponto de inflexão (*cmc*) e  $n$  é o número de espécies químicas na interface. No caso de tensioativos aniónicos monovalentes, como é caso dos derivados de treonina,  $n$  toma o valor de 2 (anião anfifílico e respetivo contra-íão,  $\text{Na}^+$ ) em água pura.<sup>71, 72</sup> Na presença de excesso de NaOH adicionado (para ajuste do pH),  $n$  toma o valor de 1<sup>73</sup>.

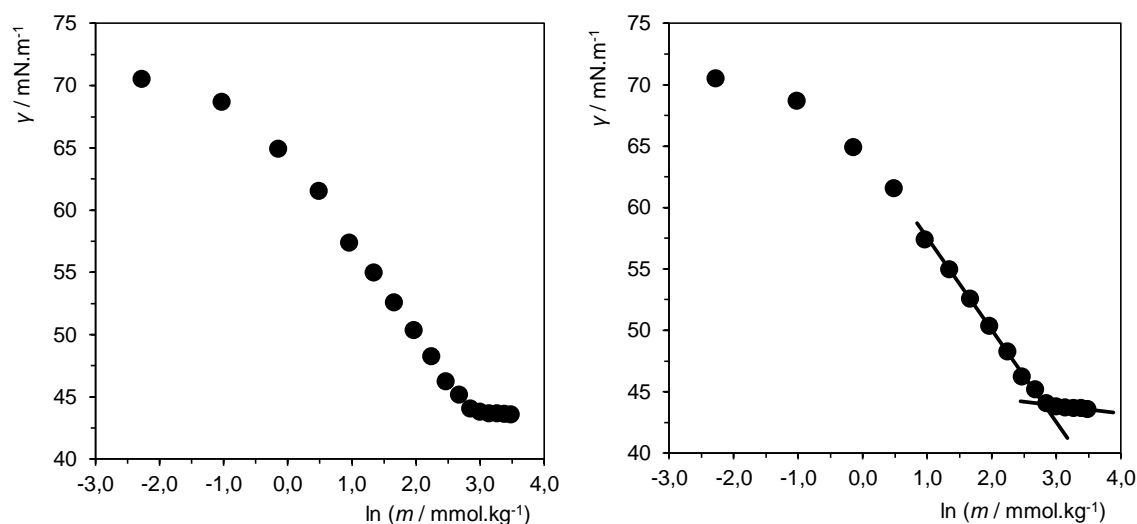
Por sua vez, a área mínima por molécula na interface ar-água,  $a_s$ , é calculada através da expressão:

$$a_s = \frac{1}{N_A \Gamma_{\max}} \quad (1.36)$$

### 3.1.1. Estudos sem pH ajustado

Seguidamente encontram-se os gráficos de tensão superficial em função do logaritmo neperiano da concentração de tensioativo para soluções de tensioativos sem pH previamente ajustado.

#### Tensioativo Na8Thr



**Figura 3.1** – Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar do composto Na8Thr,  $\theta = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

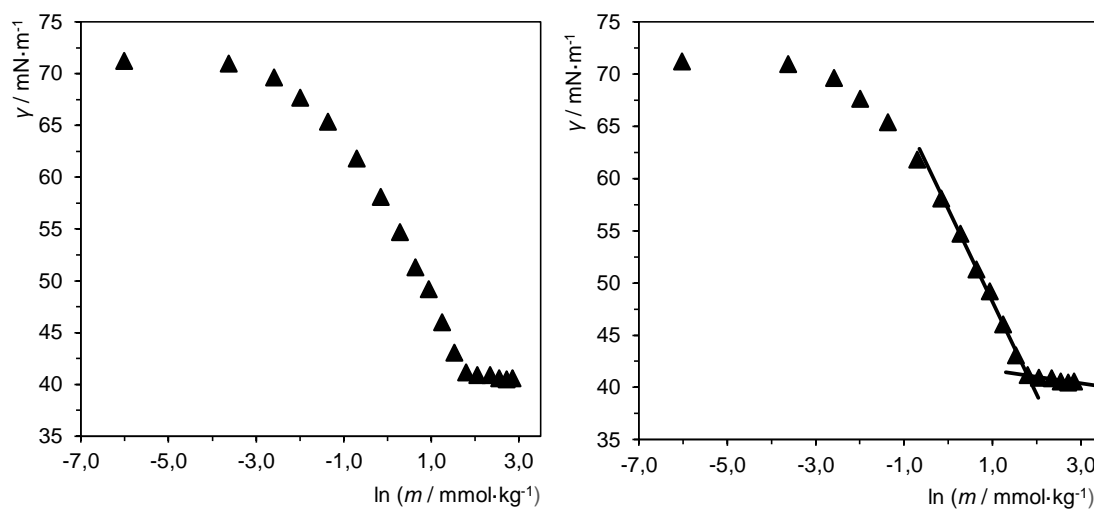
Para a determinação da *cmc* dos novos tensioativos em estudo, foi necessário obter a interseção de dois ajustes obtidos por regressão linear, tal como se pode ver na Fig. 3.1. Para uma estimativa da incerteza associada ao valor de *cmc* obtido, determinaram-se os parâmetros das retas (declive e ordenada na origem) e respetivas incertezas, com o auxílio da função *Projlin*, do aplicativo *Microsoft Office Excel*. Deste modo, a partir das equações de propagação de incertezas, determinou-se a expressão para o cálculo da incerteza da *cmc*,  $\varepsilon_{cmc}$ :

$$\varepsilon_{cmc} = \pm \ln cmc \times cmc \sqrt{\left(\frac{\varepsilon_{b'}^2 + \varepsilon_b^2}{(b' - b)^2}\right) + \left(\frac{\varepsilon_{m'}^2 + \varepsilon_m^2}{(m' - m)^2}\right)} \quad (3.1)$$

onde  $\varepsilon_{m'}$  e  $\varepsilon_m$  correspondem às incertezas associadas ao declive de cada reta ajustada e  $\varepsilon_{b'}$  e  $\varepsilon_b$  correspondem à incerteza associada à respetiva ordenada da origem. As

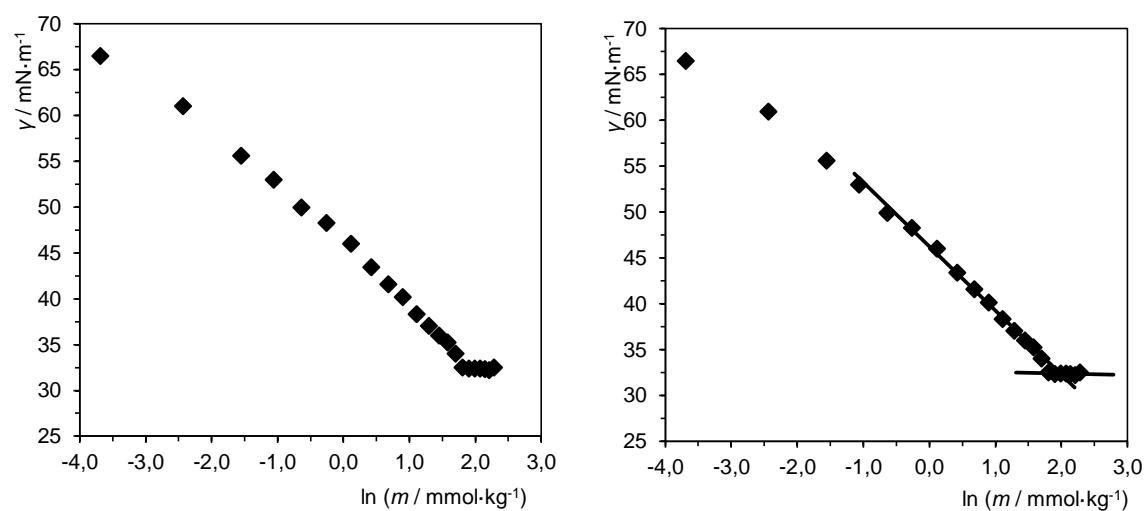
incertezas nos valores de  $\Gamma_{\max}$  e  $a_s$  foram estimadas segundo um procedimento análogo. Para as curvas dos restantes compostos procedeu-se de forma idêntica.

### Tensioativo Na10Thr



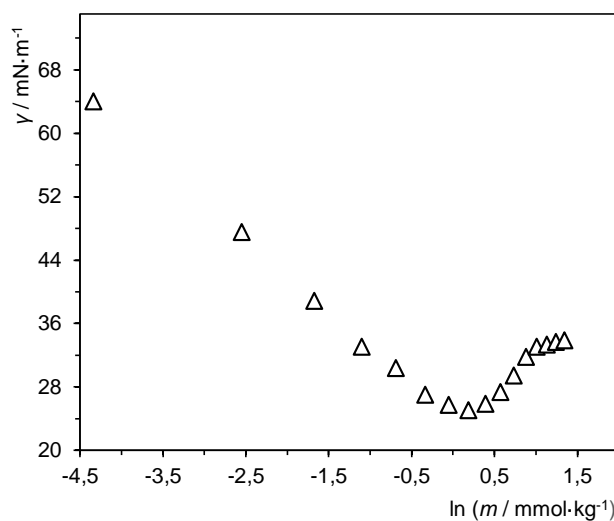
**Figura 3.2** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar do composto Na10Thr,  $\theta = 25.0$  °C.

### Tensioativo Na12Thr



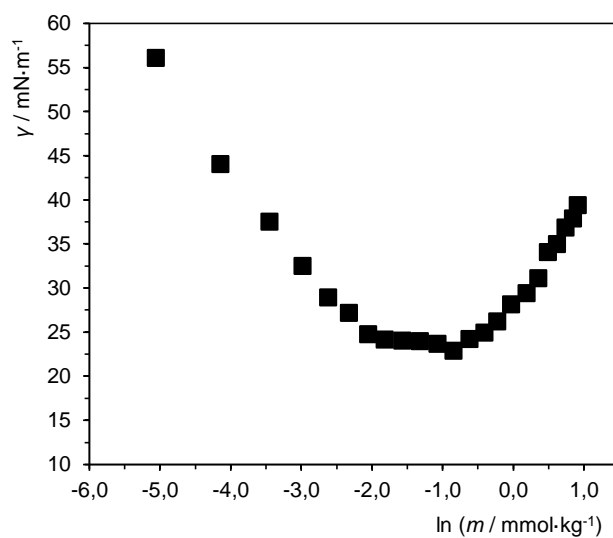
**Figura 3.3** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar do composto Na12Thr,  $\theta = 25.0$  °C.

### Tensioativo Na14Thr



**Figura 3.4** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar do composto Na14Thr,  $\theta = 40,0$  °C.

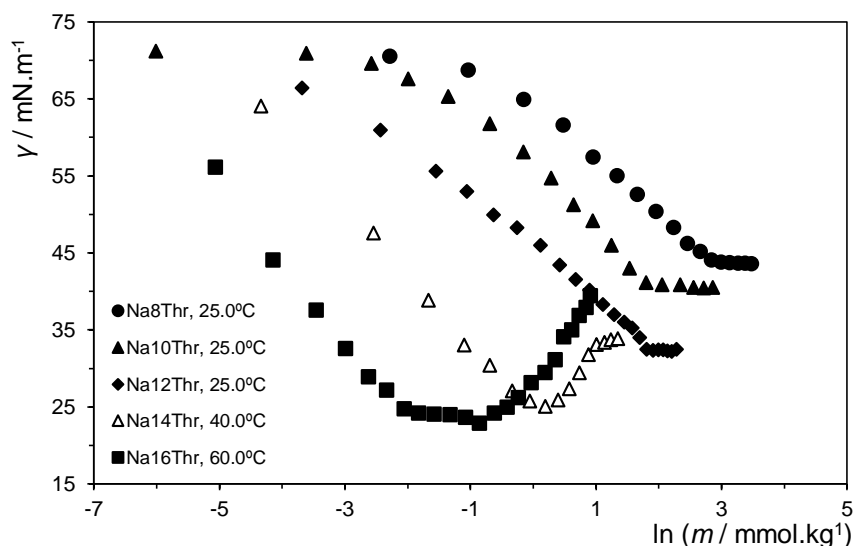
### Tensioativo Na16Thr



**Figura 3.5** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar do composto Na16Thr,  $\theta = 60,0$  °C.

No gráfico seguinte agrupam-se as curvas de tensão superficial anteriores, para uma visão comparativa das propriedades de micelização dos diferentes compostos.





**Figura 3.6** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar para a série de compostos sem pH ajustado

Como se pode verificar pelas Figura 3.4 e 3.5, existe um mínimo na curva de tensão superficial (“poço”) para as soluções aquosas de Na14Thr e Na16Thr, não sendo possível a obtenção rigorosa da *cmc* para estes compostos. A existência de mínimo sugere fortemente que as amostras possuem impurezas superficialmente ativas. A origem destas impurezas será discutida mais adiante.

Os parâmetros interfaciais calculados a partir das curvas de Na8Thr, Na10Thr e Na12Thr a 25.0 °C estão apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Parâmetros interfaciais para as soluções aquosas dos tensioativos aniônicos

Tensioativo	$\theta/^{\circ}\text{C}$	$cmc/\text{mmol.kg}^{-1}$	$\gamma_{cmc}/\text{mN.m}^{-1}$	$10^6 \Gamma_{max}/\text{mol.m}^{-2}$	$a_s/\text{nm}^2$
<b>Na8Thr</b>	25.0	$16.4 \pm 0.3$	44.0	$2.8 \pm 0.1$	$0.59 \pm 0.01$
<b>Na10Thr</b>	25.0	$8.0 \pm 0.6$	41.0	$2.6 \pm 0.1$	$0.63 \pm 0.01$
<b>Na12Thr</b>	25.0	$7.3 \pm 0.8$	32.4	$2.5 \pm 0.1$	$0.65 \pm 0.01$

Pela análise dos resultados da tabela acima, verifica-se que à medida que o número de carbonos da cadeia alquílica aumenta, a *cmc* decresce, devido ao aumento gradual do caráter hidrofóbico do composto. É verificada uma diminuição pouco significativa do excesso superficial máximo e, consequentemente, o aumento da área molecular superficial mínima.

Tratando-se de compostos aniónicos com um grupo carboxilato no seu grupo polar, estes tensioativos comportam-se como bases fracas protonáveis em solução, de acordo com a equação química:



Para os compostos Na14Thr e Na16Thr o mínimo na tensão superficial é causado pela presença em concentração suficientemente elevada da forma ácida do respetivo tensioativo, indicando que a protólise básica para estes compostos é não negligenciável. A impureza é anfifílica e sendo neutra é mais insolúvel do que o sal, e portanto mais ativa superficialmente, sendo preferencialmente adsorvida na interface água – ar, baixando assim a tensão superficial. O aumento subsequente da tensão superficial ocorre devido à dessorção da forma ácida da interface líquido – ar, devido à sua solubilização nas micelas da forma aniónica que entretanto se formam em solução. Assim, este fenómeno é responsável pela presença do mínimo para estes compostos. Como se verá adiante, a comprovação para esta explicação advém do facto que com ajuste do pH para valores alcalinos, o mínimo é suprimido.

Para este tipo de sistemas, duas importantes observações podem ser feitas.<sup>2</sup> Quando as impurezas estão presentes em baixa concentração, e a difusão a partir do seio da solução para a superfície é um fator determinante, a tensão superficial tende a decrescer lentamente com a concentração. A segunda observação prende-se com o fato de que o equilíbrio da tensão superficial é dependente da razão superfície/volume da amostra, ou seja, quanto menor o volume do seio da solução, maior é a quantidade de impureza disponível para a adsorção na interface líquido – ar, baixando ainda mais a tensão superficial.

### 3.1.2. Estudos com pH ajustado

As determinações da *cmc* para os tensioativos em estudo foram assim também efetuadas sob ajuste de pH, o que faz com que o equilíbrio da reação se desloque no sentido da formação da forma salina do tensioativo. Inicialmente, as soluções de tensioativo foram ajustadas a  $\text{pH} = 10.0 \pm 0.2$ . Contudo, o ajuste efetuado não permitiu a eliminação do mínimo de tensão superficial para Na14Thr e Na16Thr, tal como se mostrará mais adiante nas Figuras 3.14 e 3.15. Por outro lado, com ajuste de  $\text{pH} = 12.0 \pm 0.2$  com solução de NaOH  $0.1000 \text{ mol.dm}^{-3}$ , de forma a limitar a extensão da protonação destes tensioativos e evitar a forma da sua forma ácida, verificou-se a

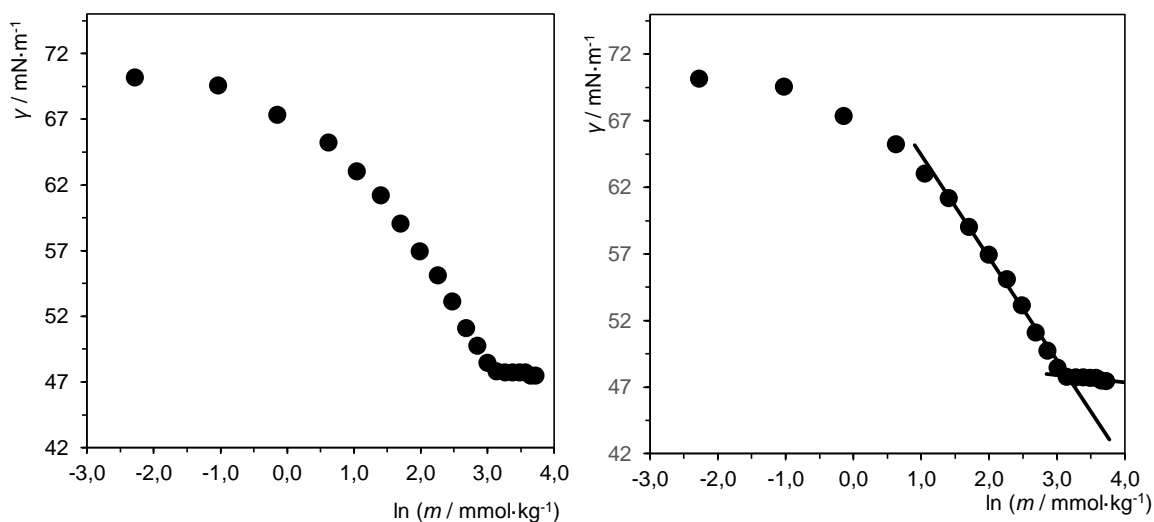
supressão do mínimo de tensão superficial. De seguida, encontram-se assim os gráficos de tensão superficial em função do logaritmo neperiano da concentração de tensioativo.

Para comparação de resultados e para obtenção da *cmc* nas mesmas condições, as soluções de Na8Thr, Na10Thr e Na12Thr também foram ajustadas a  $\text{pH}=12.0 \pm 0.2$ . Na tabela 3.2, encontram-se os valores iniciais e os valores ajustados de pH das soluções-stock para cada tensioativo.

**Tabela 3.2** – Valores de pH para as soluções-stock de tensioativo usadas

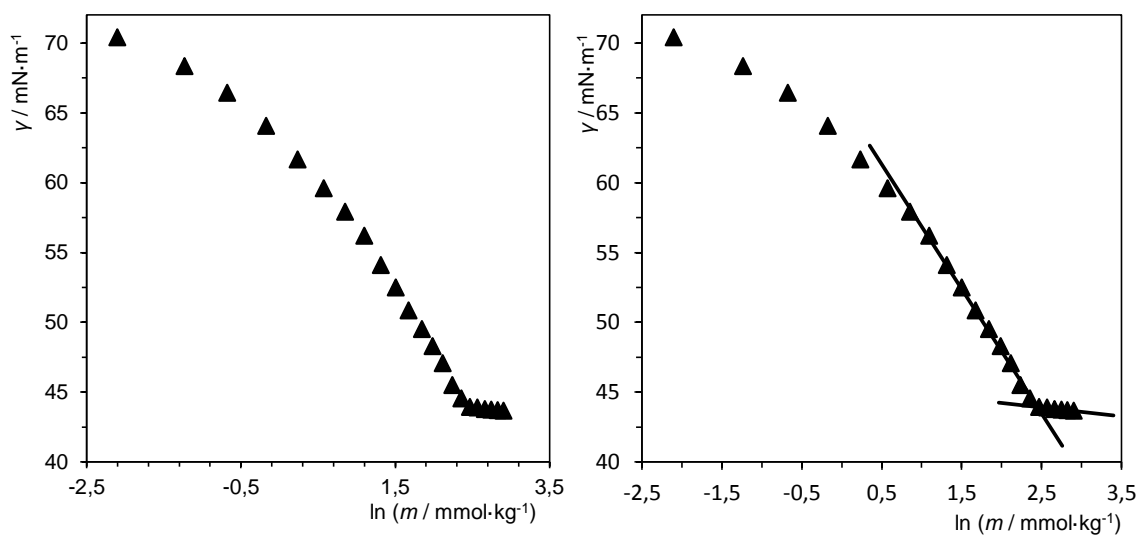
	pH inicial	pH ajustado
<b>Na8Thr</b>	7.25	12.00
<b>Na10Thr</b>	6.93	12.02
<b>Na12Thr</b>	7.34	12.00
<b>Na14Thr</b>	6.90	12.01
<b>Na16Thr</b>	7.05	12.01

### Tensioativo Na8Thr



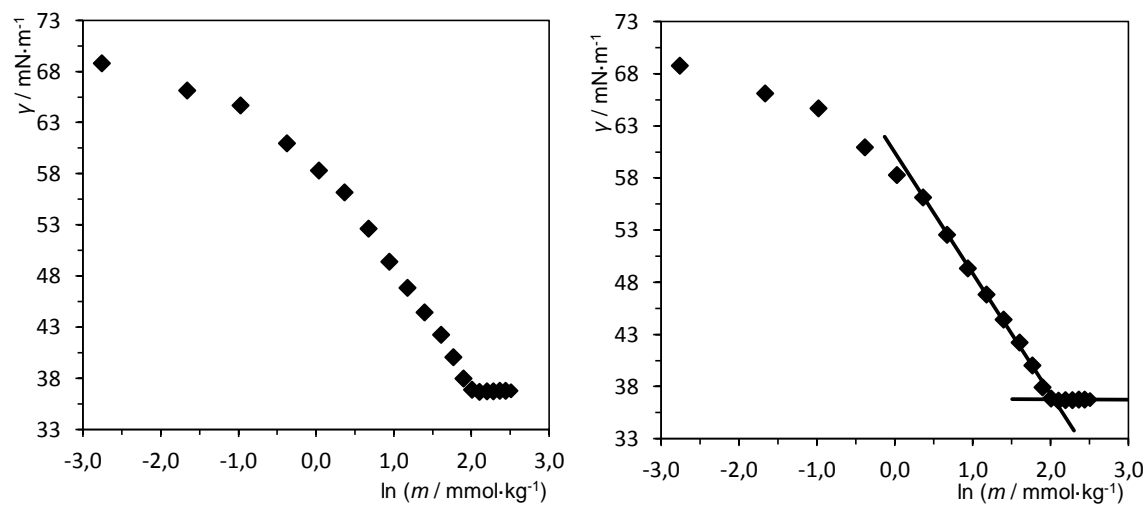
**Figura 3.7** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na8Thr,  $\theta = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  e com  $\text{pH}=12.0$

### Tensioativo Na10Thr



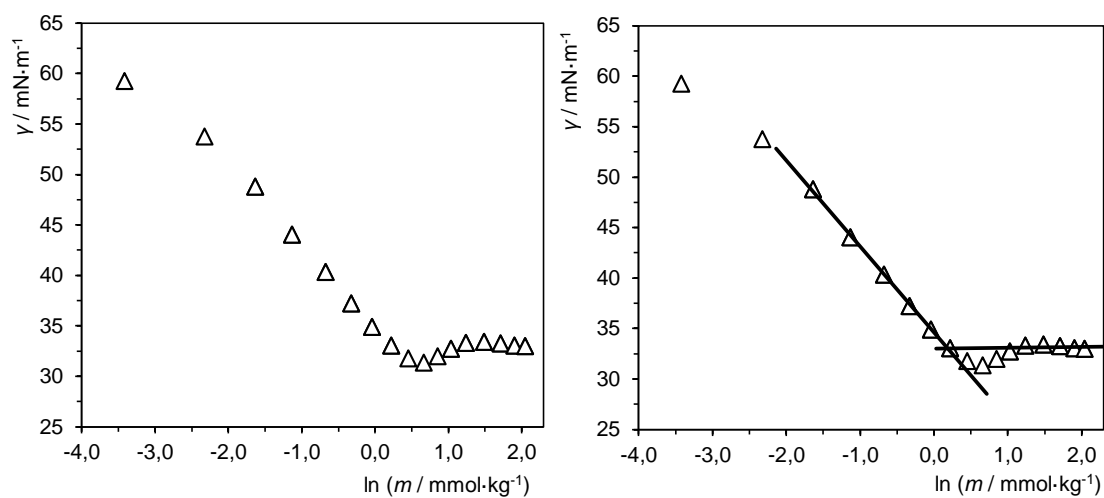
**Figura 3.8** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na10Thr,  $\theta = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  e com  $\text{pH}=12,0$

### Tensioativo Na12Thr



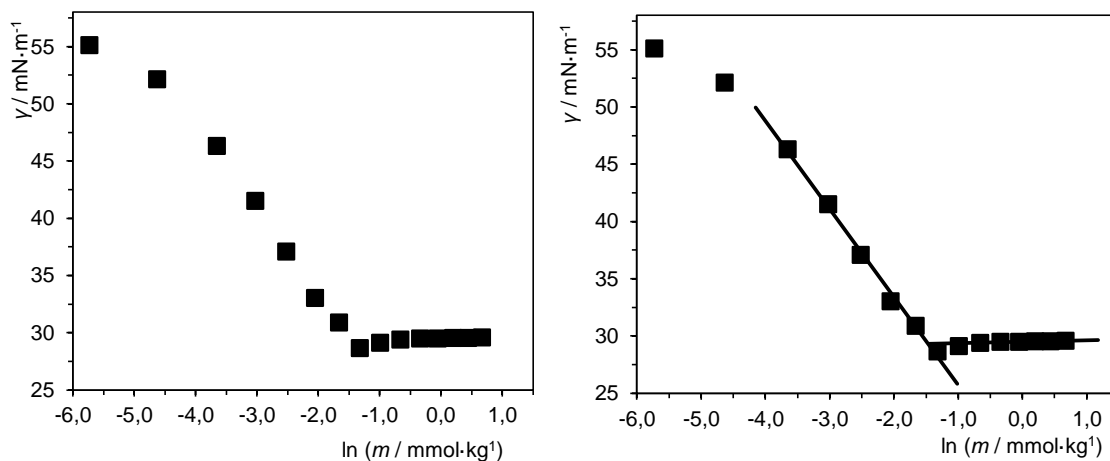
**Figura 3.9** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal do composto Na12Thr,  $\theta = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  e com  $\text{pH}=12,0$

### Tensioativo Na14Thr



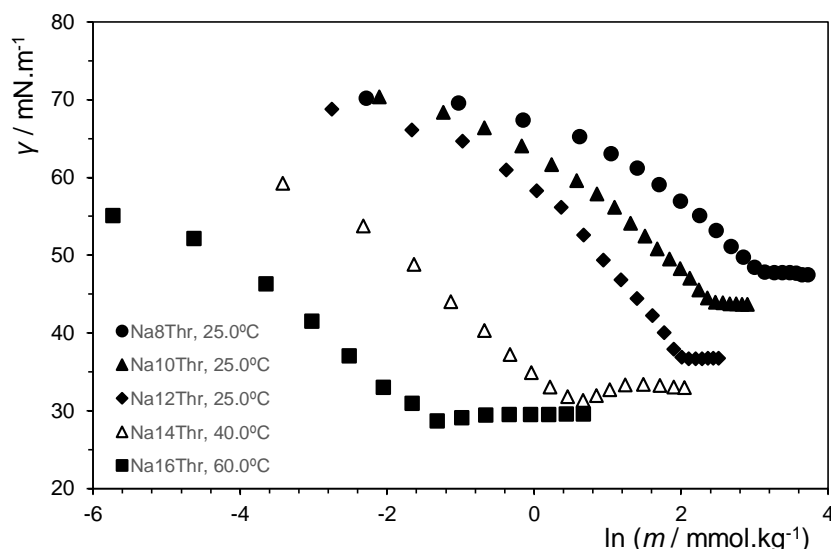
**Figura 3.10** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar do composto Na14Thr,  $\theta = 40,0$  °C e com pH=12,0

### Tensioativo Na16Th



**Figura 3.11** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar do composto Na16Th,  $\theta = 60,0$  °C e com pH=12,0

No gráfico seguinte agrupam-se as curvas de tensão superficial anteriores, para uma visão comparativa das propriedades de micelização dos diferentes compostos.



**Figura 3.12** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molal para a série de compostos com pH ajustado

Analisando detalhadamente as representações gráficas dos compostos, verifica-se que somente a curva associada ao composto Na14Thr apresenta um “mínimo” muito pouco significativo na tensão superficial. É de salientar que a presença deste tipo de efeito em tensioativos derivados de aminoácidos, mesmo sendo não ionizáveis e de elevada pureza, tem sido por vezes registada. Em qualquer caso, as curvas obtidas permitem já a determinação do valor de *cmc* para os compostos Na14Thr e Na16Thr.

Apresenta-se na Tabela 3.3 os valores referentes aos parâmetros interfaciais em estudo para todos os tensioativos, a pH ajustado para 12.0.

**Tabela 3.3.** Parâmetros interfaciais para as soluções aquosas dos tensioativos aniônicos

Tensioativo	$\theta$ / °C	<i>cmc</i> /mmol.kg <sup>-1</sup>	$\gamma_{cmc}$ /mN.m <sup>-1</sup>	$10^6 \Gamma_{max}$ /mol m <sup>-2</sup>	$a_s$ /nm <sup>2</sup>
<b>Na8Thr</b>	25.0	22.3 ± 0.3	47.8	2.7 ± 0.1	0.62 ± 0.01
<b>Na10Thr</b>	25.0	11.5 ± 0.6	43.9	3.3 ± 0.1	0.50 ± 0.01
<b>Na12Thr</b>	25.0	7.7 ± 0.6	36.8	4.3 ± 0.1	0.38 ± 0.01
<b>Na14Thr</b>	<b>40.0</b>	1.1 ± 0.6	33.7	3.0 ± 0.1	0.55 ± 0.02
<b>Na16Thr</b>	<b>60.0</b>	0.23 ± 0.04	29.3	2.6 ± 0.1	0.64 ± 0.02

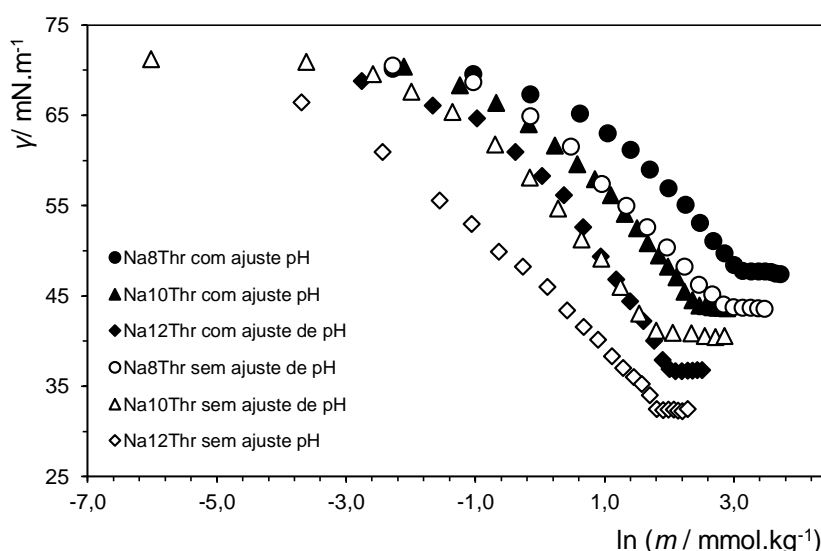
A determinação da *cmc* foi efetuada a pH fixo (pH=12.0 ± 0.2, ajustado com NaOH 0.1000mol.dm<sup>-3</sup>)

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se mais uma vez que com o aumento do número de carbonos da cadeia alquílica, a *cmc* diminui. Por outro lado, verifica-se uma

variação não monótona no que diz respeito ao excesso superficial máximo e, por conseguinte, na área molecular superficial mínima.

### 3.2. Análise comparativa dos parâmetros interfaciais obtidos: efeito do pH e do comprimento de cadeia hidrocarbonada

No gráfico 3.13 e na tabela 3.4 estão reunidos os valores dos parâmetros interfaciais para as soluções de tensioativo Na8Thr, Na10Thr e Na12Thr, realizadas à temperatura de 25.0 °C, com e sem ajuste de pH, para uma melhor visualização comparativa dos resultados das propriedades de micelização.



**Figura 3.13** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar para os compostos Na8Thr, Na10Thr, Na12Thr, sem e com pH ajustado, à temperatura de 25.0 °C.

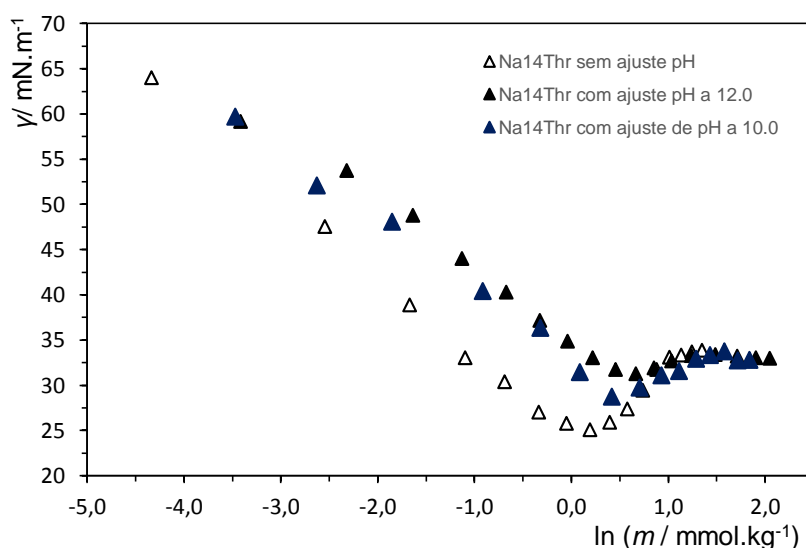
**Tabela 3.4** – Parâmetros interfaciais determinados para os tensioativos aniônicos

Tensioativo	$\theta$ / °C	$cmc$ /mmol.kg <sup>-1</sup>	$\gamma_{cmc}$ /mN.m <sup>-1</sup>	$10^6 \Gamma_{max}$ /mol m <sup>-2</sup>	$a_s$ /nm <sup>2</sup>
<b>Na8Thr</b>	25.0	16.4 ± 0.3	44.0	2.8 ± 0.1	0.59 ± 0.01
<b>Na10Thr</b>		8.0 ± 0.6	41.0	2.6 ± 0.1	0.63 ± 0.01
<b>Na12Thr</b>		7.3 ± 0.8	32.4	2.5 ± 0.1	0.65 ± 0.01
<b>Na8Thr*</b>	25.0	22.3 ± 0.3	47.8	2.7 ± 0.1	0.62 ± 0.01
<b>Na10Thr*</b>		11.5 ± 0.6	43.9	3.3 ± 0.1	0.50 ± 0.01
<b>Na12Thr*</b>		7.7 ± 0.6	36.8	4.3 ± 0.1	0.38 ± 0.01

\* A determinação da  $cmc$  foi levada a cabo a pH fixo (pH=12.0 ± 0.2, ajustado com NaOH 0.1000mol.dm<sup>-3</sup>).

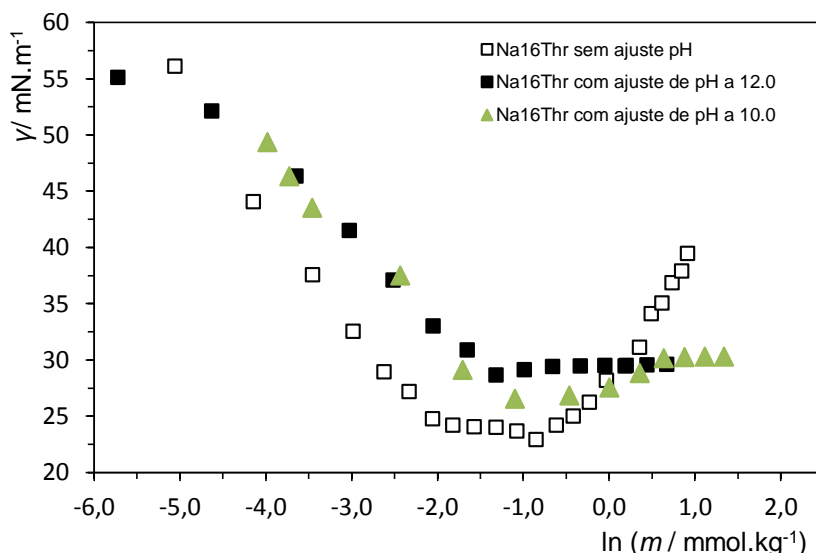
Por comparação dos valores de *cmc* obtidos para cada composto, verifica-se que há um aumento do valor da *cmc* quando o pH das soluções é ajustado a 12.0. Assim, a concentração micelar crítica dos derivados de treonina aumenta com o aumento do pH. Esta observação pode ser explicada da seguinte forma: o aumento de pH para valores suficientemente elevados ( $\text{pH} \gg \text{pK}_a$  do tensioativo) favorece o deslocamento do equilíbrio ácido-base para a forma aniónica; as micelas de tensioativo aniónico apresentam-se assim mais carregadas do que a pH mais baixo, devido à supressão praticamente total do ácido; assim, maiores repulsões eletrostáticas na superfície micelar desfavorecem o processo de micelização; consequentemente, a *cmc* aumenta.

Para os compostos Na14Thr e Na16Thr, e para melhor visualização do efeito do pH sobre as propriedades de micelização, reuniram-se, nos gráficos abaixo, as curvas de tensão superficial, sem e com ajuste de pH ( $\text{pH}=10.0$  e  $\text{pH}=12.0$ ).



**Figura 3.14** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar para o composto Na14Thr sem e com pH ajustado, à temperatura de 40.0 °C.

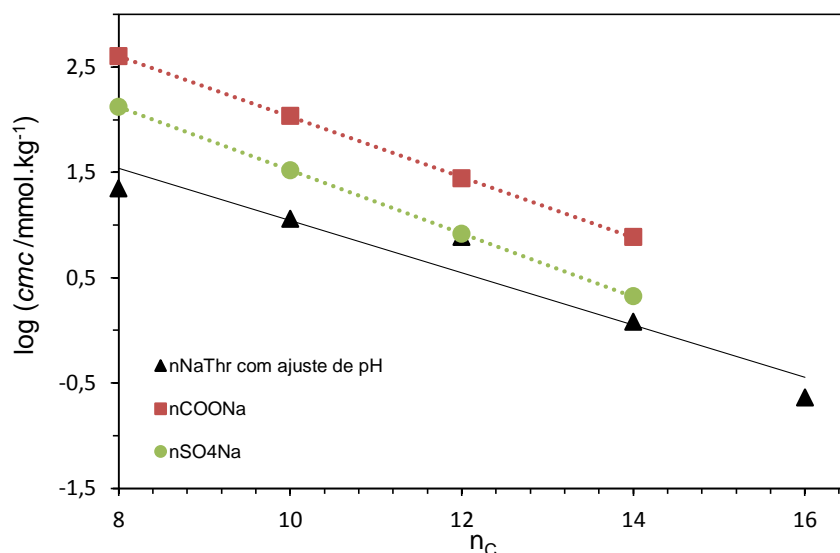




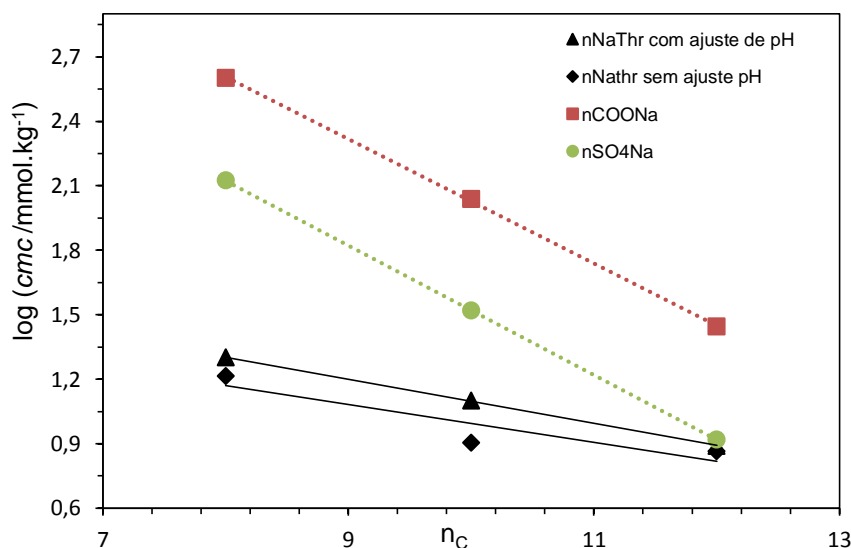
**Figura 3.15** - Tensão superficial em função do logaritmo da concentração molar para o composto Na16Thr sem e com pH ajustado, à temperatura de 60.0 °C.

Comparando-se agora os valores da *cmc* obtidos para os tensioativos com os valores de *cmc* de tensioativos convencionais (alquilcarboxilatos de sódio e alquilsulfatos de sódio) retirados da literatura, verifica-se que as *cmc*s dos tensioativos derivados de treonina são inferiores à de compostos comerciais homólogos, em particular dos alquilcarboxilatos de sódio, que possuem um grupo funcional idêntico na cabeça polar. Observa-se além disso, uma dependência linear do logaritmo neperiano da *cmc* com o do número de carbonos da cadeia alquílica ( $y = -0.25x + 3.5$ ), em linha com o comportamento comum de tensioativos iónicos, como se pode observar nas representações gráficas das Figuras 3.16 e 3.17. Os novos tensioativos apresentam valores da constante de Klevens próximos dos dos alquilcarboxilatos e alquilsulfatos de sódio. Tal significa que os novos tensioativos têm uma variação de *cmc* com o comprimento de cadeia semelhante à de outras séries homólogas de tensioativos.

Aliando, assim, os bons resultados obtidos para as propriedades interfaciais e o facto de que estes compostos advêm de fontes naturais, pode afirmar-se que os derivados de treonina se apresentam como compostos promissores para aplicações posteriores, em alternativa a tensioativos mais convencionais de origem comercial e à partida potencialmente mais biocompatíveis e biodegradáveis

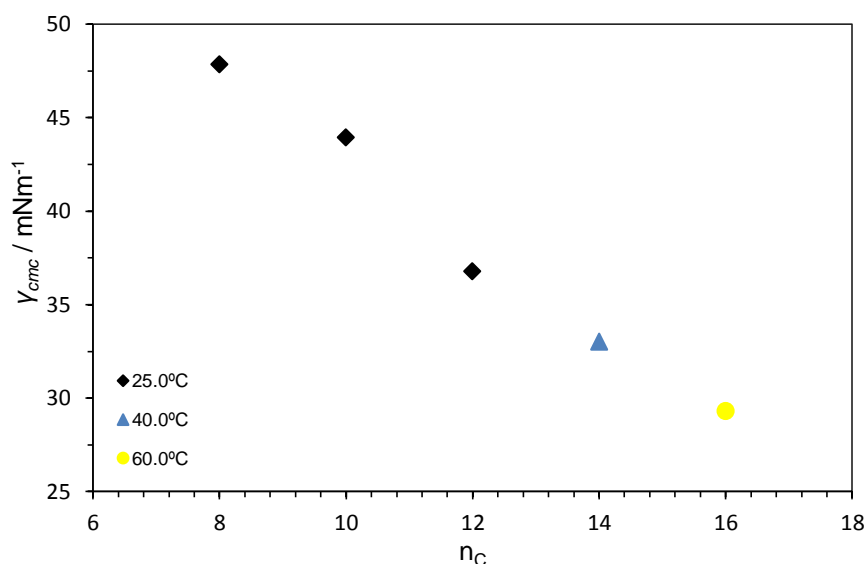


**Figura 3.16** – Regressão linear do logaritmo neperiano da cmc com o número de carbonos da cadeia alquílica para todos os compostos. Comparação com os tensoativos aniônicos convencionais com o mesmo comprimento de cadeia.



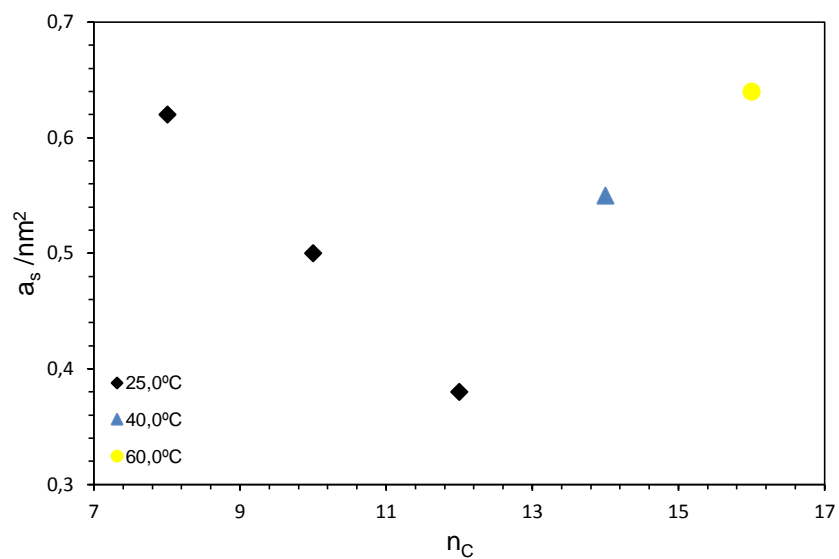
**Figura 3.17** – Regressão linear do logaritmo neperiano da cmc com o número de carbonos da cadeia alquílica para os compostos Na8Thr, Na10Thr e Na12Thr. Comparação com os tensoativos aniônicos convencionais com o mesmo comprimento de cadeia.

Na Figura 3.18 representa-se a tendência do valor da tensão superficial na *cmc* com o aumento do número de carbonos da cadeia alquílica. Analisando os resultados obtidos, verifica-se um decréscimo basicamente linear no valor da tensão superficial na *cmc* à medida que o número de carbonos aumenta, o que realça o aumento gradual do caráter hidrofóbico do composto e a sua maior atividade interfacial.



**Figura 3.18** – Variação da tensão superficial na *cmc* com o número de carbonos da cadeia alquílica para os novos compostos.

No gráfico seguinte encontra-se a representação da área molecular mínima em função do número de carbonos. Pela apreciação dos resultados, verifica-se que, para os compostos Na8Thr, Na10Thr e Na12Thr,  $a_s$  diminui com o número de carbonos da cadeia alquílica, refletindo o aumento da hidrofobicidade das moléculas, o que promove uma forte adsorção na interface. Também, a existência de grupos onde ligações intermoleculares de hidrogénio podem ocorrer (N-H e C=O) poderá reforçar a adsorção superficial, facilitando o empacotamento das moléculas na interface.<sup>74, 75</sup> Por outro lado, para os compostos Na14Thr e Na16Thr, a área molecular mínima aumenta com o aumento do número de carbonos da cadeia alquílica. Uma possível explicação para esta observação poderá ser a temperatura a que os dois compostos foram estudados, 40.0 °C e 60.0 °C.



**Figura 3.19** – Variação da área molecular mínima com o número de carbonos da cadeia alquílica para os novos compostos.

### 3.3. Comportamento de fase e microestrutural de misturas cataniónicas contendo o n-dodeciltreoninato de sódio (Na12Thr)

Foram estudadas as propriedades de agregação de misturas das novas moléculas anfífilas com tensioativos catiónicos. Os tensioativos aniónicos derivados de treonina e os tensioativos catiónicos, quando individualmente em solução aquosa, formam micelas, apresentando assim um comportamento comum. Contudo, quando em misturas cataniónicas, e por variação da razão de mistura, poderão formar outro tipo de agregados, em particular, lipossomas. Assim, o estudo de diferentes misturas cataniónicas teve como principal objetivo investigar o comportamento físico em geral e identificar, em particular, quais dos sistemas poderiam apresentar formação de lipossomas estáveis de potencial interesse para aplicações posteriores.<sup>42,46-48</sup>

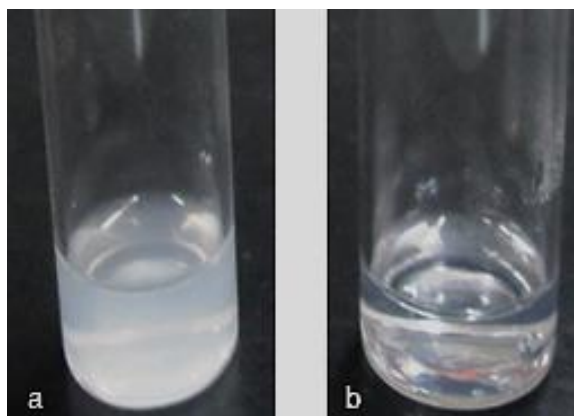
Visto apresentar bom desempenho interfacial à temperatura ambiente e não necessitar de ajuste de pH, selecionou-se o composto Na12Thr. No presente estudo, e de modo a comparar os agregados formados, foram preparadas misturas cataniónicas com alguns tensioativos catiónicos derivados de aminoácido (serina), com estrutura diferente entre si (monoméricos e diméricos ou gemini). No caso dos compostos gemini, fez-se variar o comprimento do espaçador covalente, dado que as propriedades interfaciais e de agregação dependem significativamente deste parâmetro.<sup>77</sup>

Os tensioativos catiónicos incluem assim, um tensioativo comercial, DTAB, um tensioativo monomérico derivado do amino ácido Serina, 12SerTFAC, três tensioativos geminis convencionais do tipo 12-*n*-2, com espaçador de comprimento variável (*n* = 2, 5 e 12) e dois tensioativos gemini bis quats derivados de serina.

Nestas misturas cataniónicas, a concentração total de tensioativo presente é constante e expressa em molaridade (5mM), sendo que a composição relativa dos tensioativos é expressa em fração molar do tensioativo aniónico (Na12Thr), designada por *x*. No estudo, fez-se variar a quantidade relativa dos dois tensioativos, e apenas para a mistura cataniónica Na12Thr/12SerTFAC, a concentração total de tensioativo diferiu das restantes, sendo de 10 mM.

Observou-se que a maioria das amostras com excesso de tensioativo aniónico se apresentavam como um líquido azulado (Figura 3.20 – a), enquanto, por outro lado, para um excesso de tensioativo catiónico, as amostras se apresentavam como soluções límpidas (Figura 3.20 – b). Na proximidade da linha de equimolaridade de cargas, do

lado rico em tensioativo aniónico, algumas das amostras apresentavam separação de fase de tipo líquido-líquido.

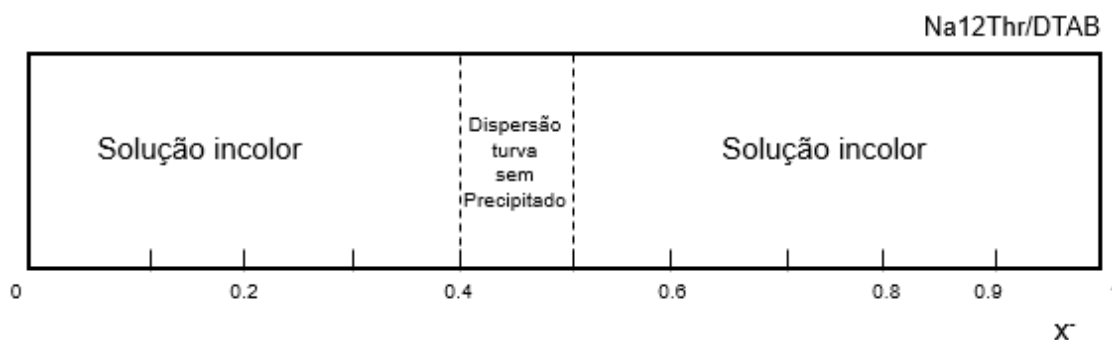


**Figura 3.20** - a) Amostra estudada do sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> ( $x^- = 0.80$ , dispersão turva); b) amostra estudada do sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> ( $x^- = 0.90$ , dispersão límpida).

A composição das amostras preparadas para as diferentes misturas catiónicas estudadas encontram-se apresentadas nas Tabelas 1 a 7 do anexo I. Nas Tabelas seguintes (3.5, 3.6, 3.10, e 3.12), apresenta-se apenas observações mais detalhadas para soluções estudadas por microscopia de luz e para a quais foi possível observar claramente a formação de agregados, ou ainda soluções que foram investigadas por outra técnicas (*cryo*-SEM e DLS).

### 3.3.1. Mistura catiónica com tensioativo monomérico comercial(DTAB)

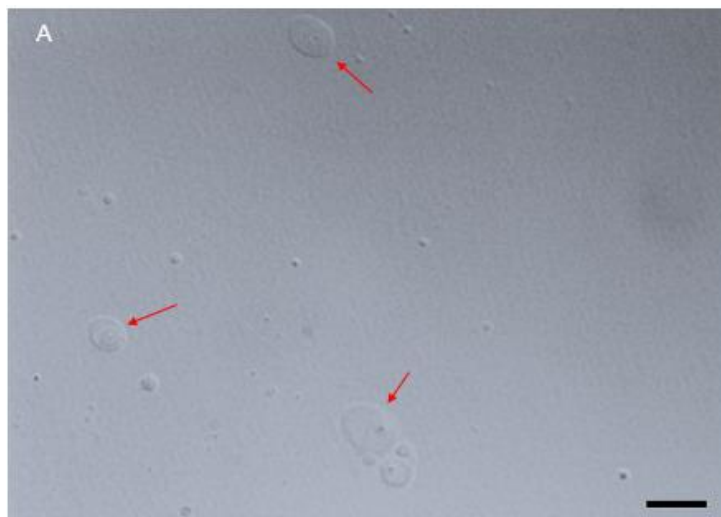
De início, as amostras da mistura Na12Thr/DTAB foram observadas macroscopicamente. A representação esquemática do comportamento físico deste sistema encontra-se representado na Figura 3.21.



**Figura 3.21** – Representação esquemática do comportamento físico macroscópico apresentado pela mistura Na12Thr/DTAB à temperatura de 25.0 °C.  $x^-$  representa a fração molar de tensioativo aniónico na mistura dos tensioativos.

Macroscopicamente, na região de déficit aniónico ( $0.4 < x^- < 0.5$ ), verifica-se que as amostras se encontram turvas e sem precipitado, enquanto que as restantes amostras cataniónicas se apresentam incolores. As amostras turvas das misturas foram observadas por microscopia de luz.

Na Figuras 3.22, apresenta-se uma micrografia da mistura cataniónica Na12Thr/DTAB à temperatura ambiente, como exemplo representativo.



**Figura 3.22** – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/DTAB,  $x^- = 0.40$ . Presença de lipossomas multivesiculares. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$

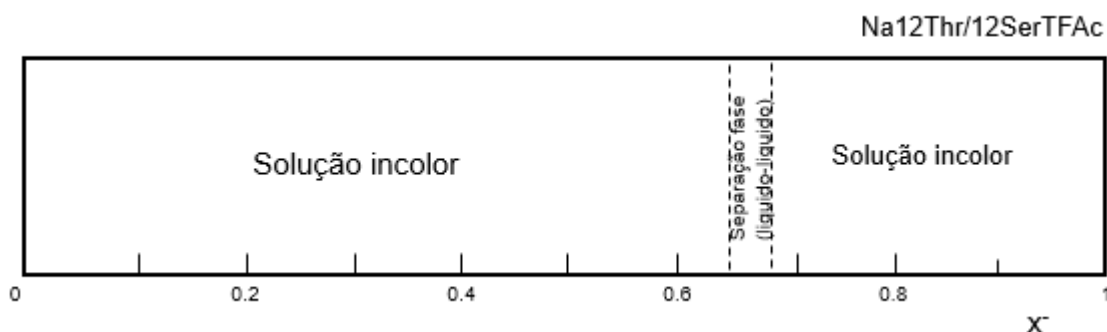
Observou-se a presença de lipossomas aparentemente unilamelares e também multivesiculares para a fração de mistura  $x^- = 0.40$ . Para a fração de mistura  $x^- = 0.50$ , embora se apresente macroscopicamente turva, fator possivelmente indicativo da presença de agregados de elevada dimensão (tipicamente  $> 0.5 \mu\text{m}$ ), tal não se verificou.

**Tabela 3.5** – Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura cataniónica Na12Thr/DTAB para  $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$

Mistura	Amostra	$x^-$	Observações
Na12Thr/DTAB 5 mM	A	0.40	Dispersões turvas e sem precipitado; presença de lipossomas (5-20 $\mu\text{m}$ )
	-	0.50	Dispersões turvas e sem precipitado; sem lipossomas visíveis

### 3.3.2. Mistura cataniónica com tensioativo monomérico derivado de serina (12SerTFAc)

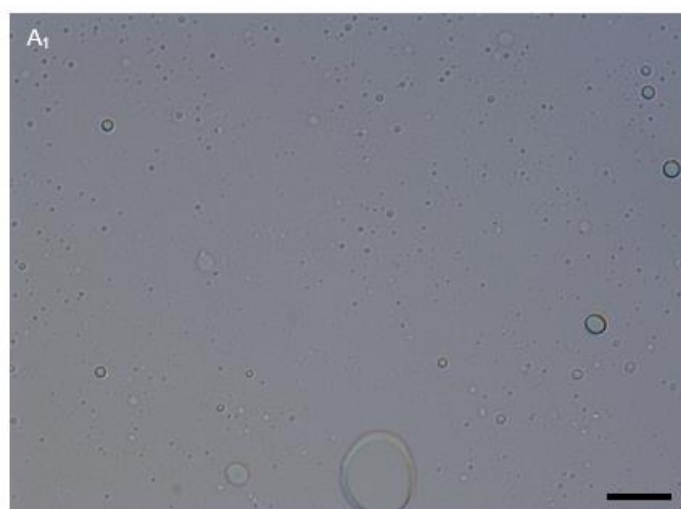
A representação esquemática do comportamento fásico apresentado pela mistura Na12Thr/12SerTFAc encontra-se representado na Figura 3.23.



**Figura 3.23** – Representação esquemática do comportamento fásico macroscópico apresentado pela mistura Na12Thr/12SerTFAc à temperatura de 25.0 °C.

Para esta mistura cataniónica, verificou-se a presença de uma dispersão turva e sem precipitado apenas para uma das composições estudadas; em agitação era possível visualizar pequenas gotículas de líquido no seio da solução. Assim, esta amostra foi a mais detalhadamente estudada. As restantes encontram-se apresentadas em anexo.

Na Figura 3.24, apresenta-se uma micrografia da mistura cataniónica Na12Thr/12SerTFAc à temperatura ambiente, como exemplo representativo.



**Figura 3.24** – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12SerTFAc,  $x' = 0.67$  Separação de fase (líquido-líquido). Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .



Microscopicamente, é comprovado que existe separação de fase líquido-líquido na zona próxima à de equimolaridade de carga, podendo sugerir que neste sistema o par cataniónico presumivelmente formado,  $12\text{Thr}^- / \text{DTA}^+$ , assume características de um líquido iónico. No entanto, esta questão necessitará de estudos aprofundados posteriores.

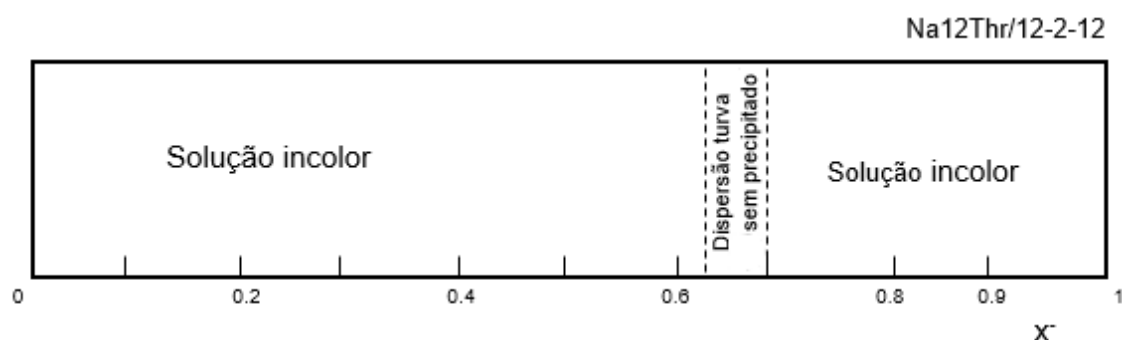
**Tabela 3.6** - Comportamento fásico e microestrutural de amostras seleccionadas da mistura cataniónica Na12Thr/12SerTFAC para  $T = 25.0\text{ }^\circ\text{C}$

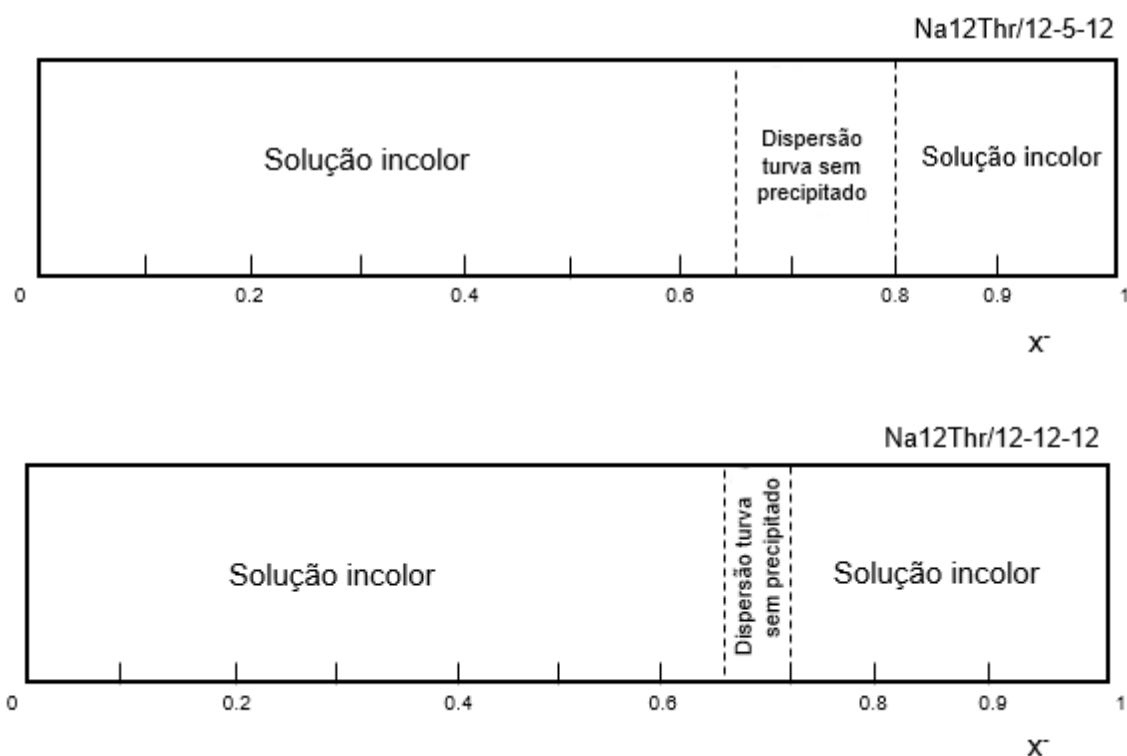
Misturas	Amostras	$x^-$	Observações
Na12Thr/12SerTFAC 10 mM	A <sub>1</sub>	0.67	Dispersão turva e sem precipitado; separação líquido-líquido; sem lipossomas visíveis

### 3.3.3. Mistura cataniónica com tensioativos gemini bis-quat 12-n-12

Foram estudadas misturas cataniónicas entre Na12Thr e geminis convencionais com comprimento crescente de espaçador ( $n = 2, 5$  e  $12$ ).

Para uma melhor análise comparativa, a representação esquemática do comportamento fásico apresentado pelas três misturas Na12Thr/12-n-12 apresenta-se na Figura 3.25.



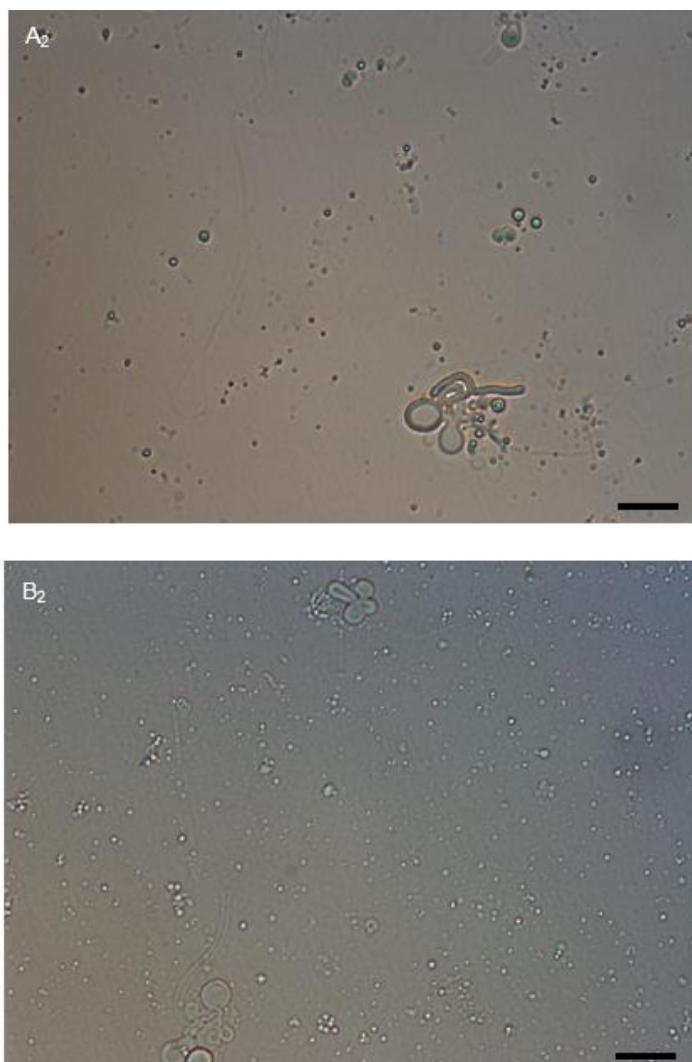


**Figura 3.25** – Representação esquemática do comportamento físico macroscópico apresentado pelas misturas Na12Thr/12-n-12 à temperatura de 25.0 °C.

Após observações macroscópicas das amostras, verificou-se que à temperatura ambiente existem diferentes regiões físicas. Maioritariamente, para um excesso de tensioativo aniónico, as amostras encontram-se turvas e sem precipitado. Por outro lado, para um défice de tensioativo aniónico, as amostras apresentavam-se como soluções límpidas.

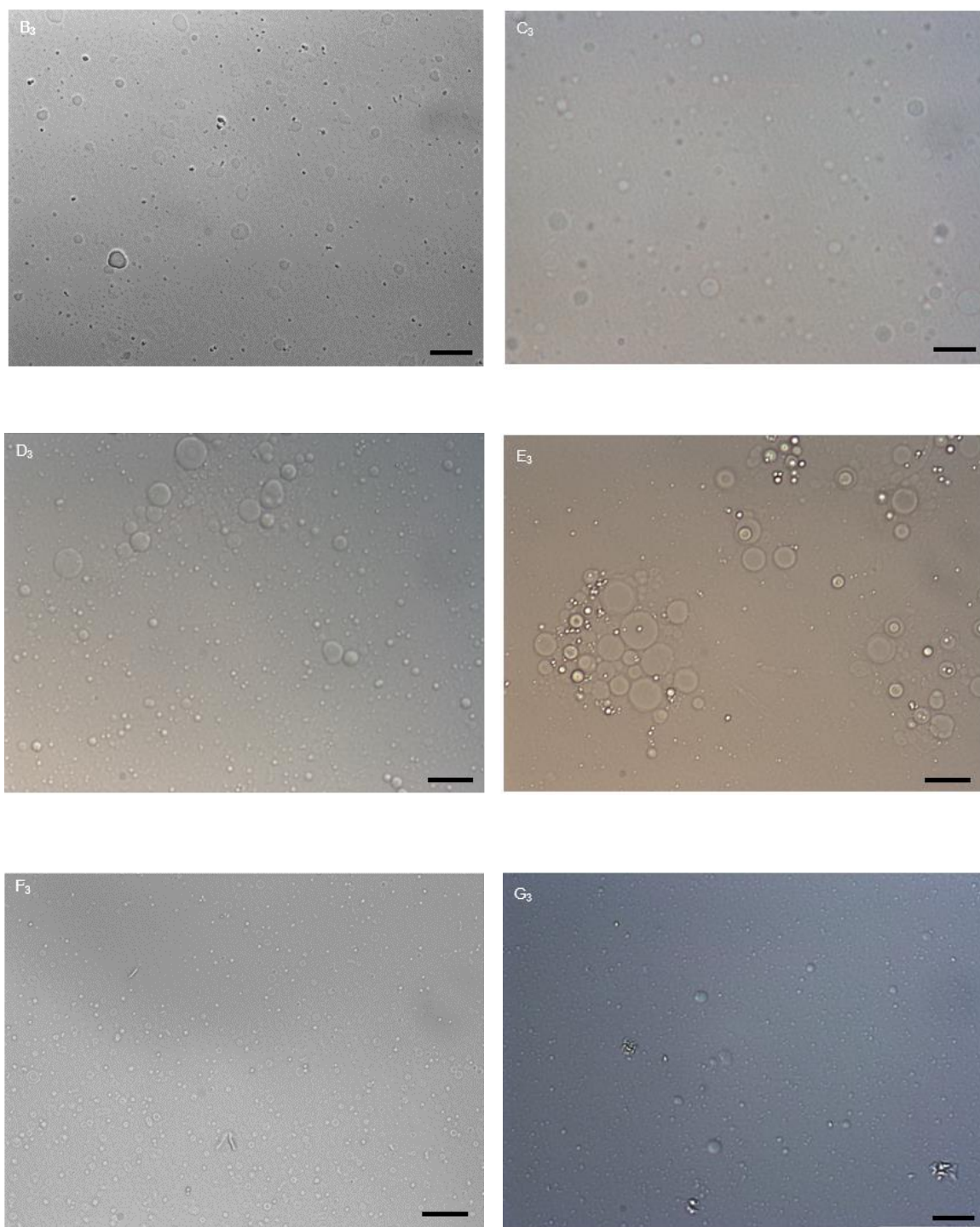
Para observação do comportamento microestrutural das amostras cataniónicas que se apresentavam turvas e sem precipitado, recorreu-se, inicialmente, à microscopia de luz polarizada. As restantes frações de mistura encontram-se em anexo.

Sequências representativas de micrografias das misturas cataniónicas Na12Thr/12-n-12 à temperatura ambiente, são apresentadas nas Figura 3.26, 3.27 e 3.28.

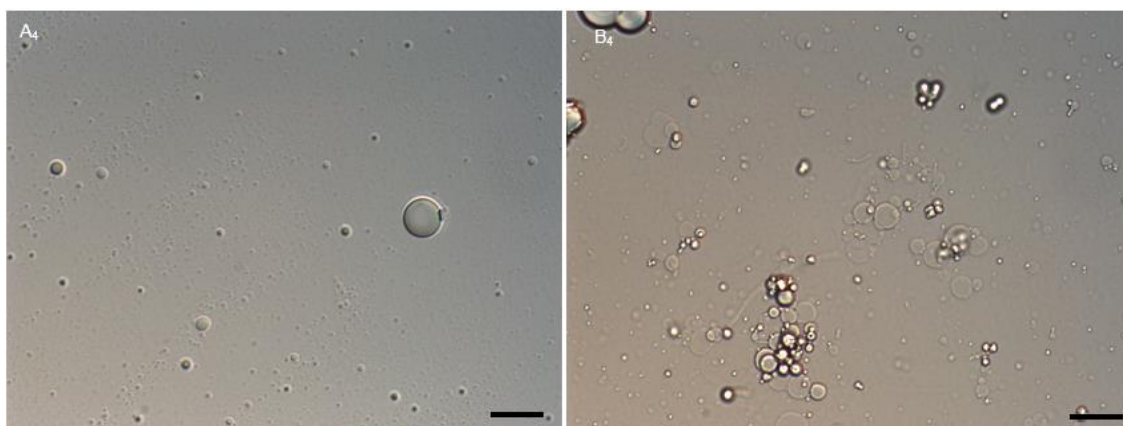


**Figura 3.26** – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12-2-12. Na amostra  $x^- = 0.67$  (A<sub>2</sub>) e 0.70 (B<sub>2</sub>) observam-se lipossomas e agregados tubulares. Barras de escala de A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub> = 20 $\mu$ m





**Figura 3.27** – Comportamento em solução da mistura catiónica Na12Thr/12-5-12. Em todas as frações molares  $x' = 0.65$  (A<sub>3</sub>);  $x' = 0.67$  (B<sub>3</sub> e C<sub>3</sub>);  $x' = 0.70$  (D<sub>3</sub>);  $x' = 0.73$  (E<sub>3</sub>);  $x' = 0.75$  (F<sub>3</sub>) e  $x' = 0.80$  (G<sub>3</sub>), foram observados lipossomas esferóides. Barras de escala = 20  $\mu\text{m}$  e para a micrografia C<sub>3</sub> = 28  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.28** – Comportamento em solução da mistura cataniónica Na12Thr/12-12-12. Na amostra  $x^- = 0.67$  ( $A_4$ ) foi observada separação de fase (líquido - líquido). Na amostra  $x^- = 0.70$  ( $B_4$ ) observaram-se lipossomas esferóides e agregados tubulares. Barras de escala =  $20\mu\text{m}$ .

Para as três misturas cataniónicas observadas anteriormente, e para um excesso de tensioativo aniónico é possível visualizar por microscopia, agregados vesiculares esferóides (Figura 3.26  $A_2$  e  $B_2$ ; Figura 3.27 – todas as micrografias e Figura 3.28 –  $B_4$ ), agregados tubulares (Figura 3.26 –  $A_2$ ,  $B_2$ ) e Figura 3.28 –  $B_4$ ) e uma região de separação de fase líquido – líquido (Figura 3.28 –  $A_4$ ).

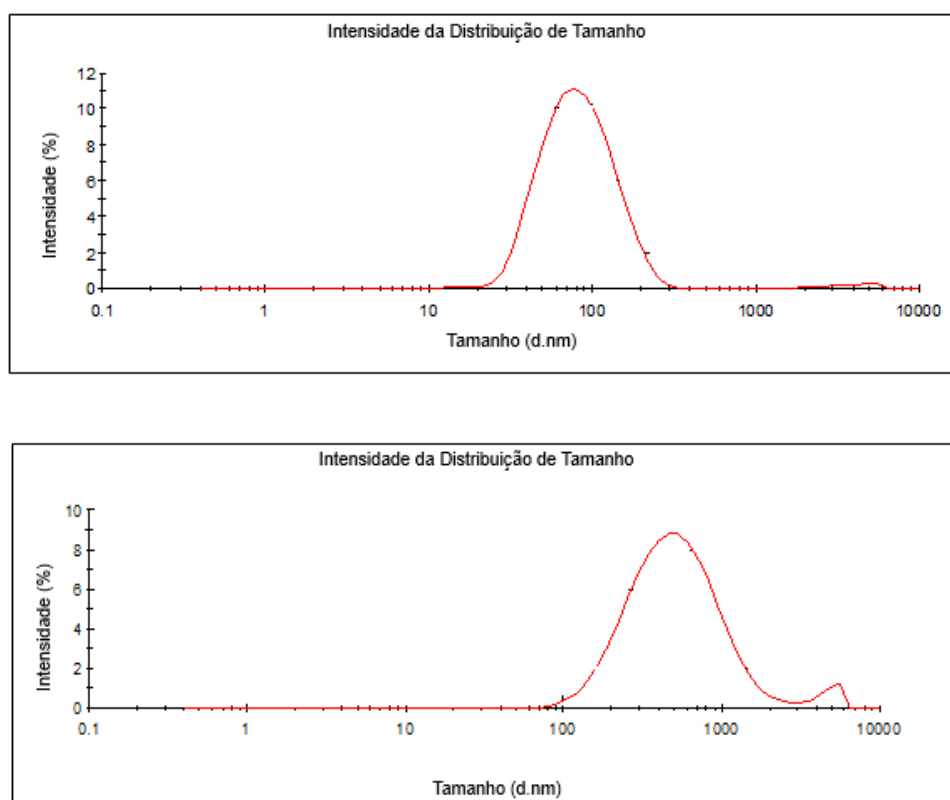
Para um excesso de tensioativo catiónico, as amostras apresentam-se sob a forma de uma solução incolor, não se detetando agregados por microscopia. Para o conjunto de amostras turvas não se verifica birrefringência. Tal facto indica a inexistência de estruturas multilamelares de grande dimensão e pressupõe que os agregados visualizados nas Figuras 3.26, 3.27 e 3.28 serão lipossomas unilamelares ou oligolamelares (baixo número de bicamadas concêntricas).

Para complementação do estudo efetuado por microscopia de luz, foram realizados a  $25.0\text{ }^\circ\text{C}$  estudos de dispersão dinâmica de luz para diferentes composições dos sistemas cataniónicos Na12Thr/12-n-12, tendo-se selecionado para todos as frações molares  $x^- = 0.67$  e  $x^- = 0.70$ , para efeitos comparativos.

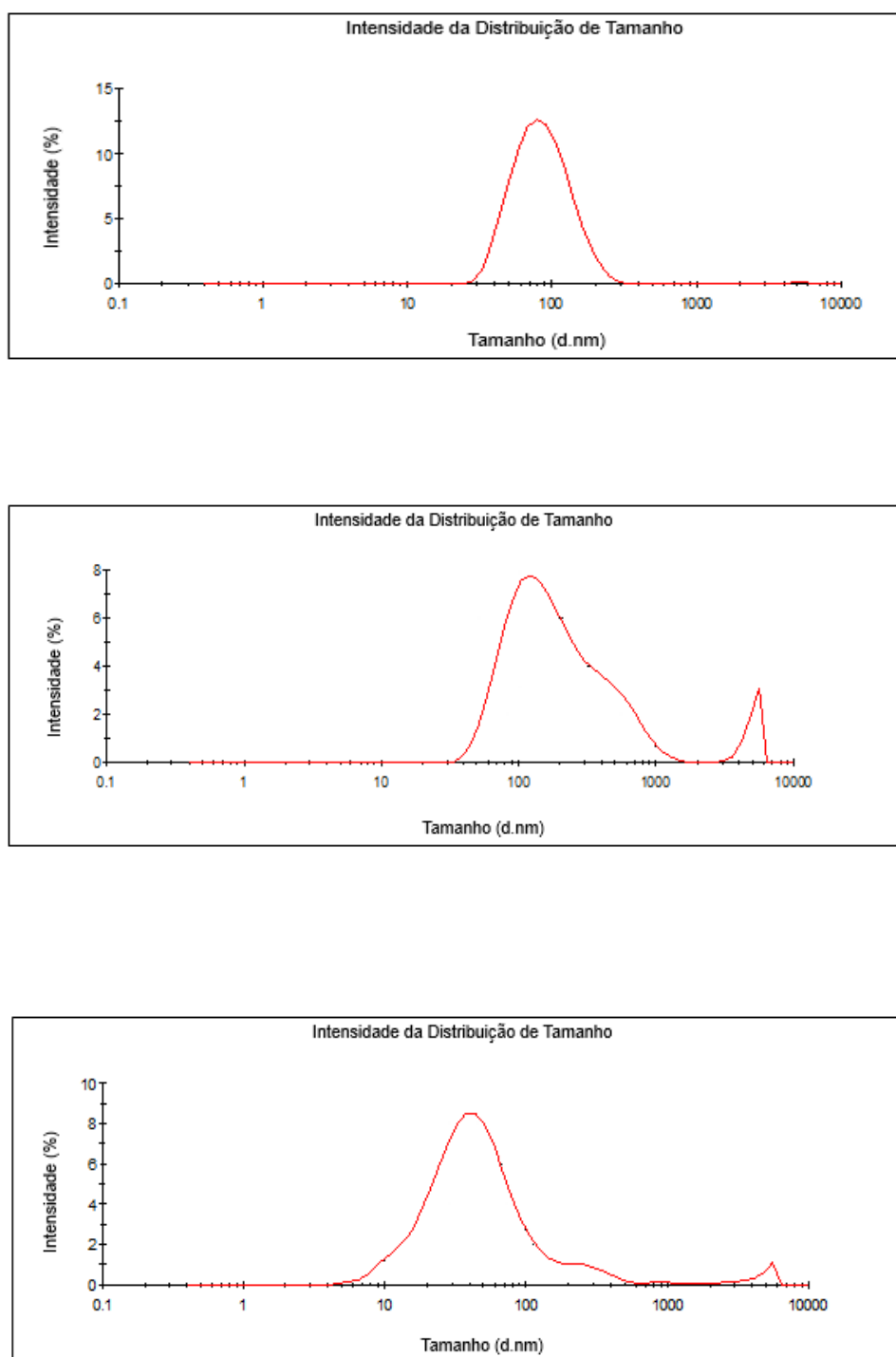
**Tabela 3.7** – Diâmetro hidrodinâmico médio ( $\pm$ SD), frequência populacional dos agregados para os respectivas frações catiónicas, e grau de dispersão a  $T=25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Mistura	IP		População 1		População 2	
	$x^-$		Diâmetro médio lipossomas /nm	Frequência populacional /%	Diâmetro médio lipossomas /nm	Frequência populacional /%
<b>Na12Thr/12-2-12</b> <b>5 mM</b>	0.67	0.21	89 $\pm$ 5	98	4053 $\pm$ 811	2
	0.70	0.18	92 $\pm$ 7	100	-	-
<b>Na12Thr/12-5-12</b> <b>5 mM</b>	0.67	0.31	539 $\pm$ 26	96	4838 $\pm$ 227	4
	0.70	0.54	233 $\pm$ 18	94	5019 $\pm$ 158	6
<b>Na12Thr/12-12-12</b> <b>5 mM</b>	0.70	0.27	48 $\pm$ 4	77	261 $\pm$ 95	23

Nas Figuras 3.29 e 3.30 apresenta-se a distribuição gaussiana de tamanhos dos lipossomas relativos às frações de mistura, apresentadas na tabela 3.7.



**Figura 3.29** – Distribuição de tamanho em função da intensidade para a fração  $x^- = 0.67$  para Na12Thr/12-2-12 e Na12Thr/12-5-12



**Figura 3.30** – Distribuição de tamanho em função da intensidade para a fração  $x = 0.70$  para Na12Thr/12-2-12, Na12Thr/12-5-12 e Na12Thr/12-12-12.

Tal como nas observações por microscopia de luz, também por dispersão dinâmica de luz se verifica a existência de diferentes tamanhos de lipossomas.

No caso particular do sistema Na12Thr/12-2-12, e com o aumento da fração aniónica de tensioativo, verifica-se um aumento pouco significativo do diâmetro médio dos agregados, que se apresentam com baixa polidispersão em solução.

Contrariamente, verifica-se uma diminuição do diâmetro médio dos agregados com o aumento da fração de tensioativo aniónico para a solução cataniónica de Na12Thr/12-5-12. Contudo, os agregados presentes na solução de fração molar  $x^- = 0.70$ , evidenciam um certo grau de polidispersão ( $> 0.5$ ).

Para o sistema cataniónico Na12Thr/12-12-12, os resultados obtidos por dispersão dinâmica de luz para a fração  $x^- = 0.67$ , não mostraram qualidade de medição, o que está de acordo com o facto de se observar separação líquido - líquido. Por outro lado, para a fração  $x^- = 0.70$ , os agregados detetados apresentam dimensões idênticas à dos lipossomas grandes, apresentando-se com baixa polidispersão em solução.

O comportamento das amostras cataniónicas anteriores foi igualmente caracterizado por medições de potencial zeta. Os resultados obtidos são descritos na Tabela 3.8.

**Tabela 3.8** – Potencial zeta para as diferentes razões de mistura dos sistemas cataniónicos.

Mistura Cataniónica	$x^-$	Potencial zeta /mV
Na12Thr/12-2-12 5 mM	0.67	-47.2
	0.70	-51.2
Na12Thr/12-5-12 5 mM	0.67	-32.1
	0.70	-39.0
Na12Thr/12-12-12 5 mM	0.70	-34.8

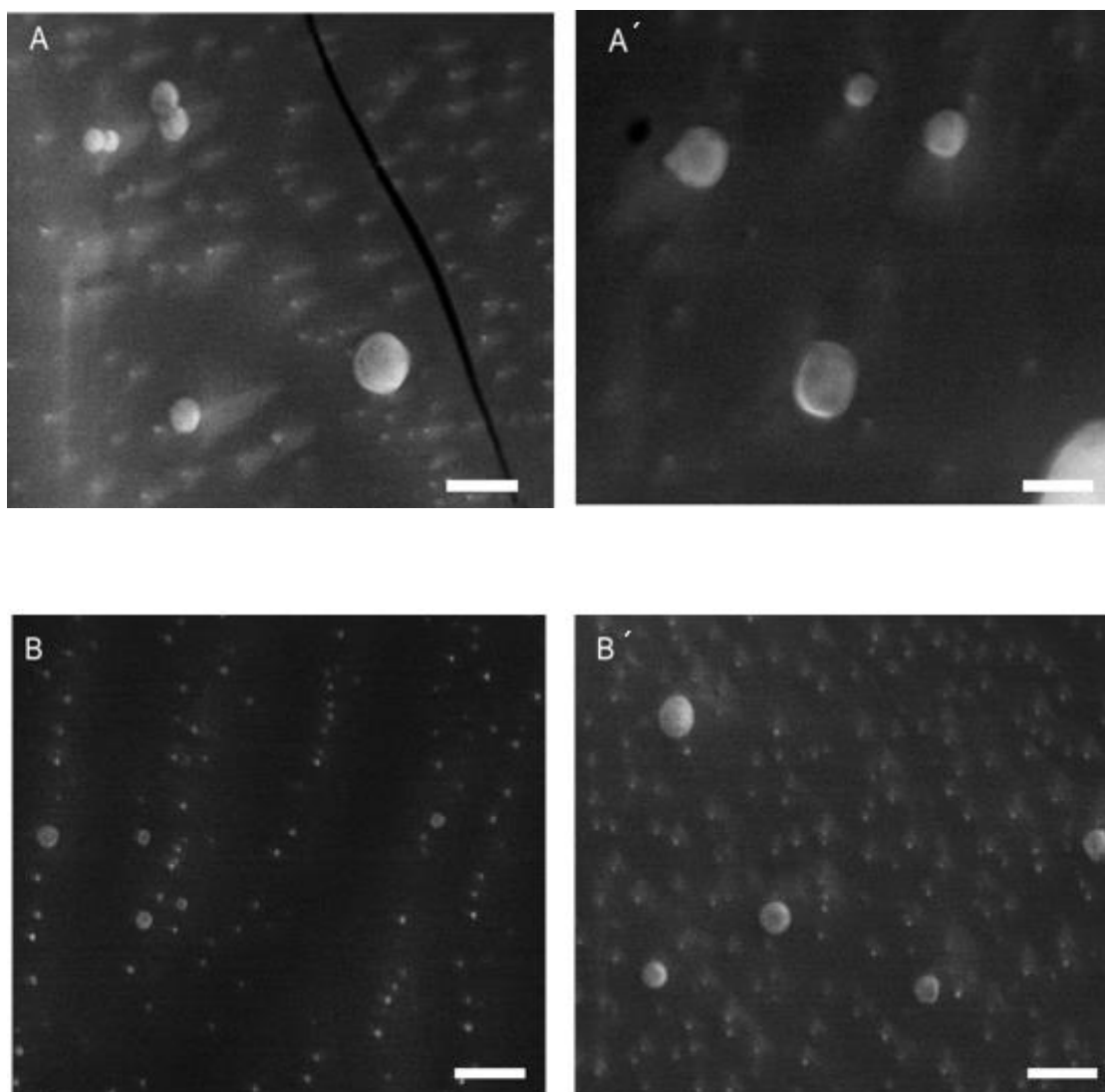
Os valores de potencial zeta obtidos estão relacionados com a densidade de carga superficial dos lipossomas. Assim, e tendo em conta os valores obtidos, comprova-se que os agregados formados nas respetivas soluções são maioritariamente constituídos pelo tensioativo aniónico. Por outro lado, o potencial zeta torna-se mais negativo com o aumento da concentração de tensioativo aniónico na mistura, tal como se poderia esperar.

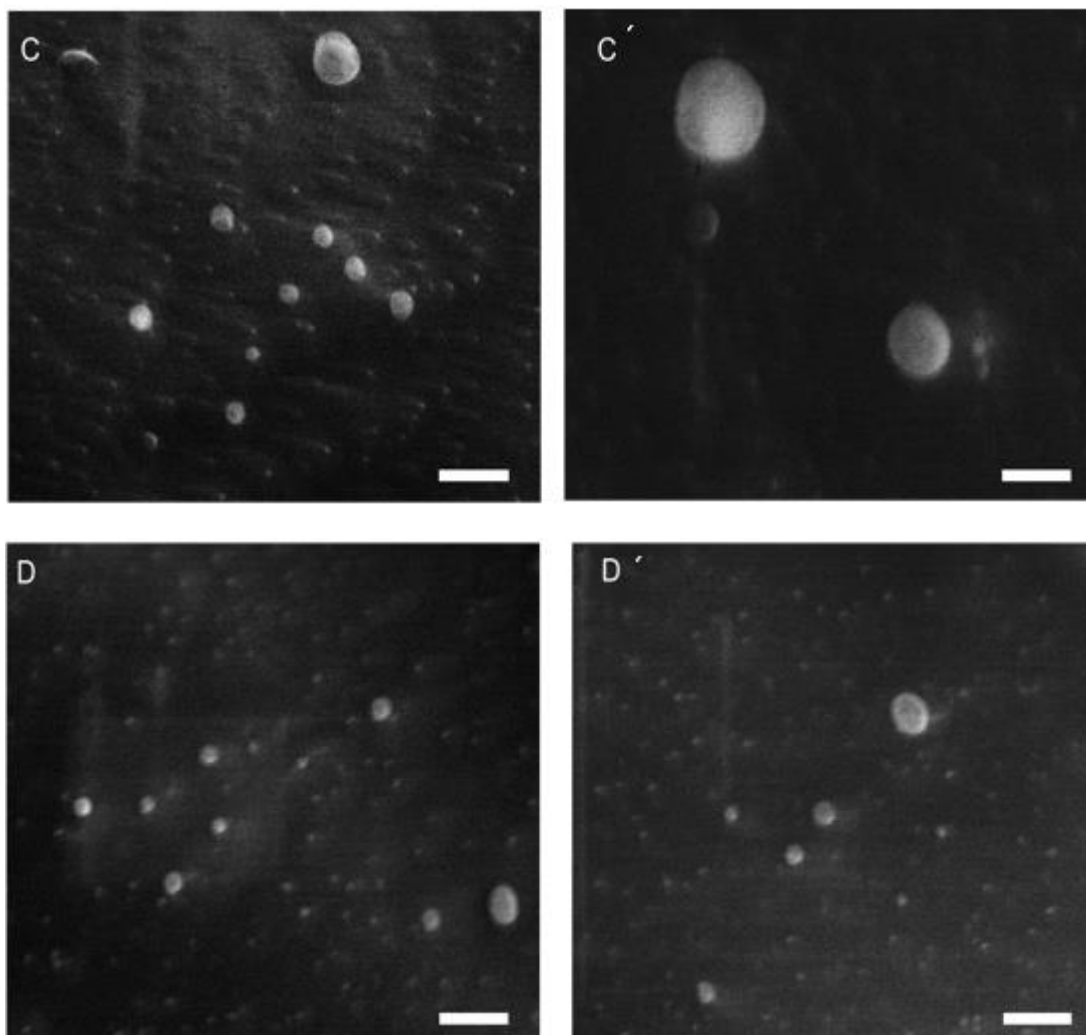
Por *cryo* – SEM foi possível observar detalhadamente a estrutura morfológica de alguns dos agregados vesiculares. Assim, foram analisadas quatro amostras de maior



relevância, já estudadas por microscopia de luz polarizada e dispersão dinâmica de luz, de modo a caracterizar melhor algumas das estruturas visualizadas anteriormente.

As imagens de *cryo*-SEM apresentadas na Figura 3.31 dizem respeito a estruturas presentes nas dispersões turvas das misturas cataniónicas acima referenciadas.





**Figura 3.31** – Comportamento em solução das misturas catiónicas Na12Thr/12-2-12,  $x^- = 0.67$  (A e A'), Na12Thr/12-5-12,  $x^- = 0.67$  (B e B');  $x^- = 0.70$  (C e C') e Na12Thr/12-12-12,  $x^- = 0.70$  (D e D'). Todas as micrografias das misturas catiónicas apresentam lipossomas esféricos. Barra de escala de 1 e 2  $\mu\text{m}$ .

Em todas as imagens, observam-se lipossomas esféricos aparentemente unilamelares, com uma gama de diâmetros compreendida entre 5 e 20  $\mu\text{m}$ .

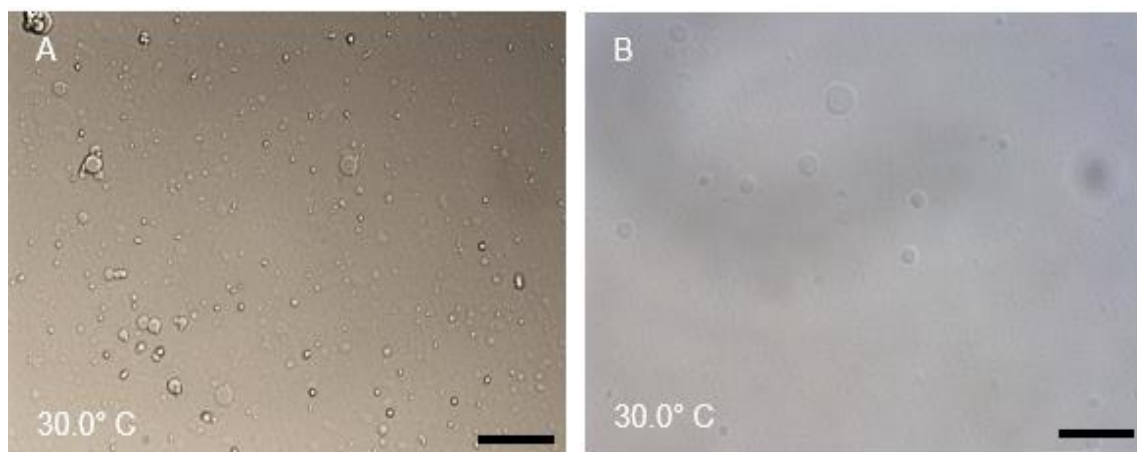
Na Tabela 3.9 apresenta-se uma análise qualitativa da gama de tamanhos dos agregados vesiculares para o sistema catiónico Na12Thr/12-n-12 observados por microscopia de luz, para comparação com as micrografias correspondentes obtidas por *cryo*-SEM.

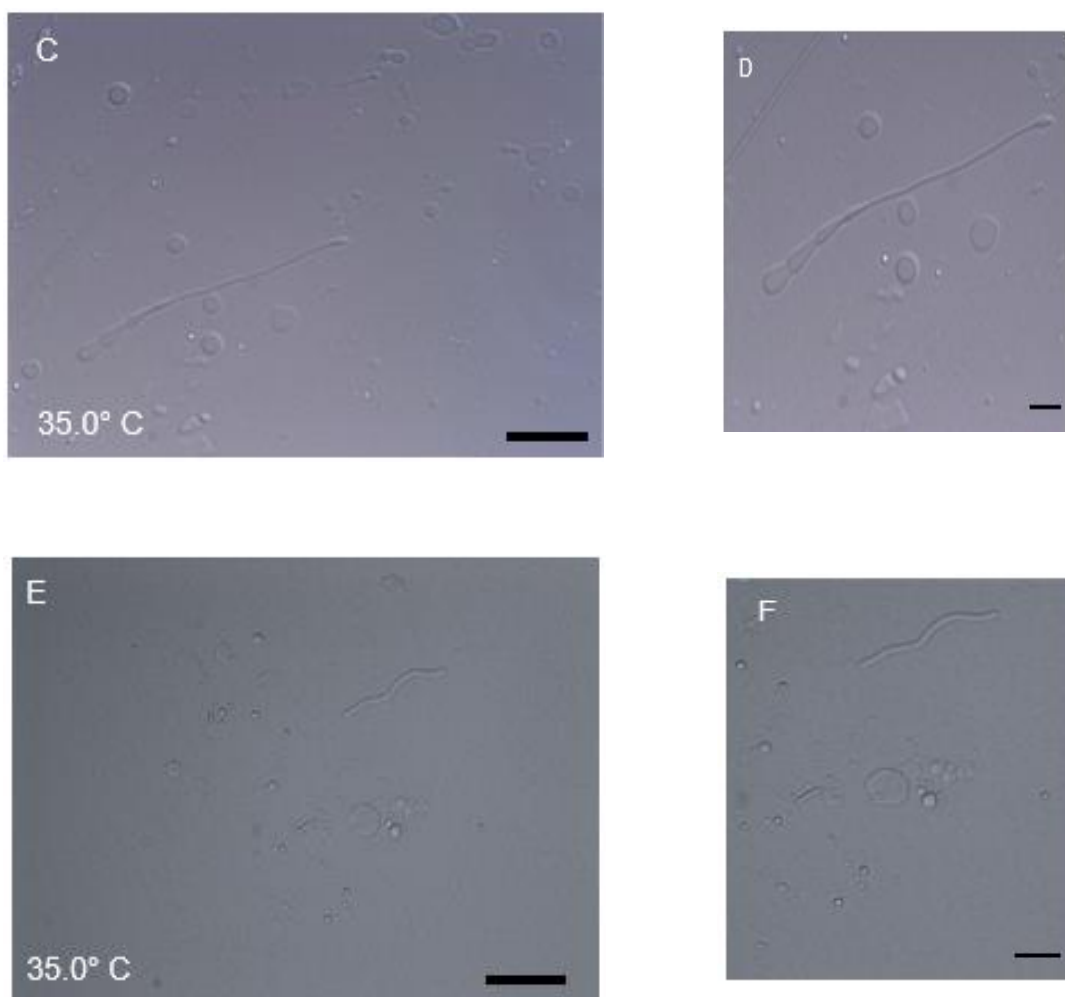
**Tabela 3.9** – Gama de tamanhos de lipossomas para as misturas cataniónicas Na12Thr/12-*n*-12

Mistura	$x^-$	Diâmetro dos lipossomas (gama aparente) / $\mu\text{m}$	Diâmetro da população dominante / $\mu\text{m}$
Na12Thr/12-2-12 5 mM	0.67	1-15	1-5
Na12Thr/12-5-12 5 mM	0.67	1-15	5-10
	0.70	1-20	1-10
Na12Thr/12-12-12 5 mM	0.70	1-15	1-10

Sendo o sistema Na12Thr/12-5-12 o que apresentava mais interessantes resultados, ou seja, maior gama de frações de mistura com agregados vesiculares, efetuou-se um estudo das soluções cataniónicas com variação da temperatura, para além dos estudos já referidos.

À temperatura ambiente, as misturas cataniónicas encontravam-se sob a forma de uma dispersão turva e sem precipitado, e após aquecimento ocorreram alterações nas frações  $x^- = 0.67$  e  $x^- = 0.70$  como descrito na Tabela 3.11. As micrografias inerentes ao comportamento em solução das frações citadas anteriormente, à temperatura de 30.0 °C e 35.0 °C, encontram-se na Figura 3.32, como exemplo representativo.





**Figura 3.32** – Comportamento em solução da mistura catiónica Na12Thr/12-5-12 (A e B) a 30.0°C e (C, D, E e F) a 35.0°C. Barras de escala de A, B, C e E = 20µm; D e G = 10µm. Presença de lipossomas esféricos e agregados tubulares

Na micrografia A,  $T = 30.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  é visualizada a presença de agregados vesiculares e partículas sólidas em solução. Por outro lado, para a micrografia B, não se verifica a existência de partículas sólidas, sendo visíveis apenas lipossomas. Para ambas as micrografias a  $T = 35.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e para além de agregados esféricos, é verificada a existência de agregados tubulares, indicando que o aumento da temperatura induz alteração de morfologia para este sistema.

**Tabela 3.10** – Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura cataniónica Na12Thr/12-*n*-12 para  $T = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$

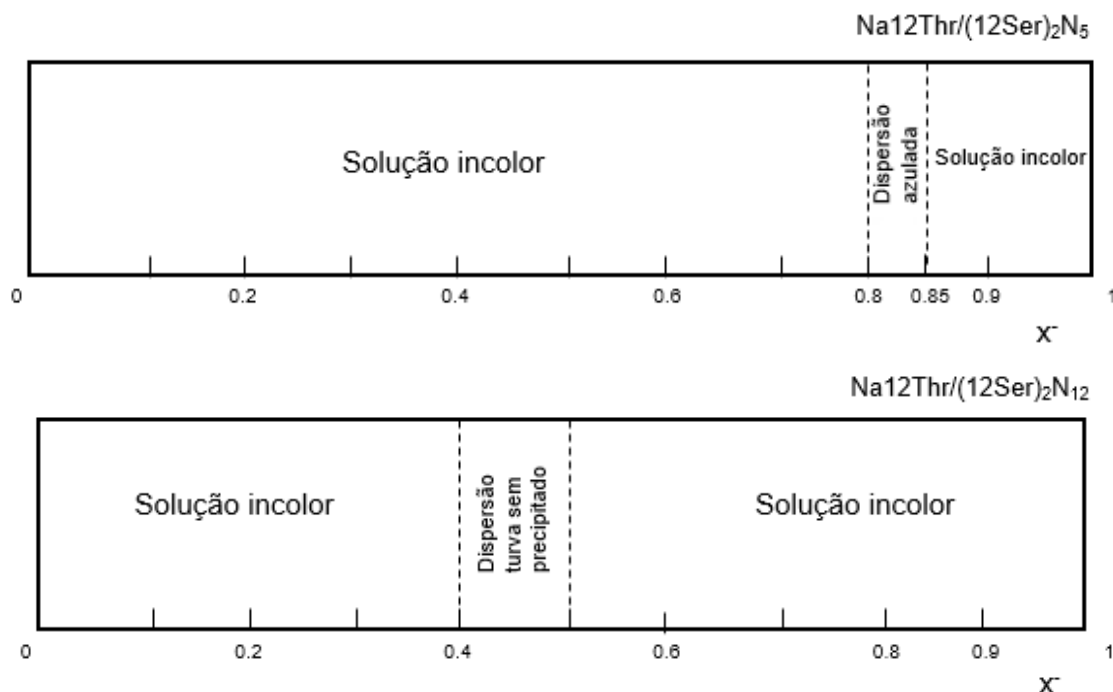
Misturas	Amostras	$x^-$	Observações
Na12Thr/12-2-12 5 mM	A <sub>2</sub>	0.67	Dispersões turvas e sem precipitado; lipossomas e agregados tubulares (1-15 $\mu\text{m}$ )
	B <sub>2</sub>	0.70	
Na12Thr/12-5-12 5 mM	A <sub>3</sub>	0.65	Dispersões turvas e sem precipitado; lipossomas (1-20 $\mu\text{m}$ )
	B <sub>3</sub> , C <sub>3</sub>	0.67	
	D <sub>3</sub>	0.70	
	E <sub>3</sub>	0.73	
	F <sub>3</sub>	0.75	
	G <sub>3</sub>	0.80	
Na12Thr/12-12-12 5 mM	A <sub>4</sub>	0.67	Dispersões turvas e sem precipitado; separação de fase (liq:liq)
	B <sub>4</sub>	0.70	Dispersões turvas e sem precipitado; lipossomas e agregados tubulares (1-10 $\mu\text{m}$ )

**Tabela 3.11** - Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura cataniónica Na12Thr/12-5-12 para  $T = 30.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $35.0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Misturas	Amostras	$\bar{x}$	Observações	
			30.0 °C	35.0 °C
Na12Thr/12-5-12 5 mM	A	0.67	Dispersão turva com precipitado; lipossomas (5-15 $\mu\text{m}$ )	Dispersão turva com precipitado; lipossomas e agregados tubulares (5-10 $\mu\text{m}$ )
	B	0.70		
	C e D	0.67		
	E e F	0.70		

### 3.3.4. Misturas cataniónicas com tensioativos bis-quat derivados de serina (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e (12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>

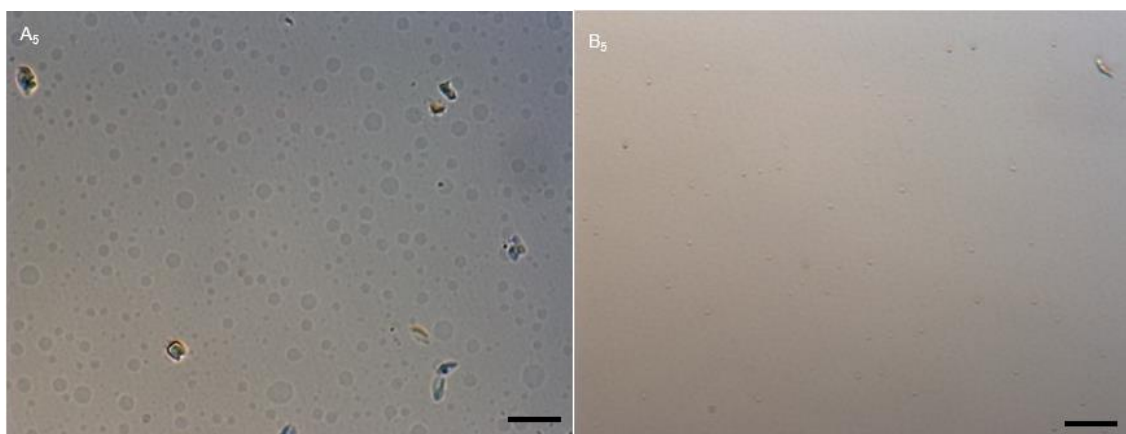
De início, as amostras da mistura Na12Thr/tensioativos bis-quats derivados de serina foram observadas macroscopicamente. A representação esquemática do comportamento fásico deste sistema encontra-se na Figura 3.33.



**Figura 3.33** – Representação esquemática do comportamento fásico macroscópico apresentado pelas misturas Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub> à temperatura de 25.0 °C.

Após observações das misturas, verificou-se que para o sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub>, e na região de excesso aniónico, as amostras se encontravam azuladas. Por seu lado, para o sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>, foi visualizada uma região onde as amostras se encontravam turvas e sem precipitado.

As várias soluções das duas misturas cataniónicas foram observadas por microscopia de luz polarizada. Somente as frações molares referidas na Tabela 3.12 apresentam agregados visíveis (Figuras 3.34).



**Figura 3.34** – Comportamento em solução da mistura catiónica Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub>,  $x^- = 0.80$  (A<sub>5</sub>) e Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>,  $x^- = 0.40$  (B<sub>5</sub>). A<sub>5</sub> - vesículos esferóides e B<sub>5</sub> – solução micelar. Barras de escala = 20 $\mu$ m

A micrografia A<sub>5</sub> mostra agregados vesiculares para o sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub>, enquanto que para a solução catiónica Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub> não se observaram agregados por microscopia, podendo tratar-se de uma solução micelar.

**Tabela 3.12** - Comportamento fásico e microestrutural de amostras selecionadas da mistura catiónica Na12Thr/geminis bis-quats de serina para T = 25.0 °C

Misturas	Amostras	$x^-$	Observações
Na12Thr/(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>5</sub> 5 mM	A <sub>5</sub>	0.80	Dispersão azulada; lipossomas (5-15 $\mu$ m)
Na12Thr/(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>12</sub> 5 mM	B <sub>5</sub>	0.40	Dispersão turva e sem precipitado; sem lipossomas visíveis

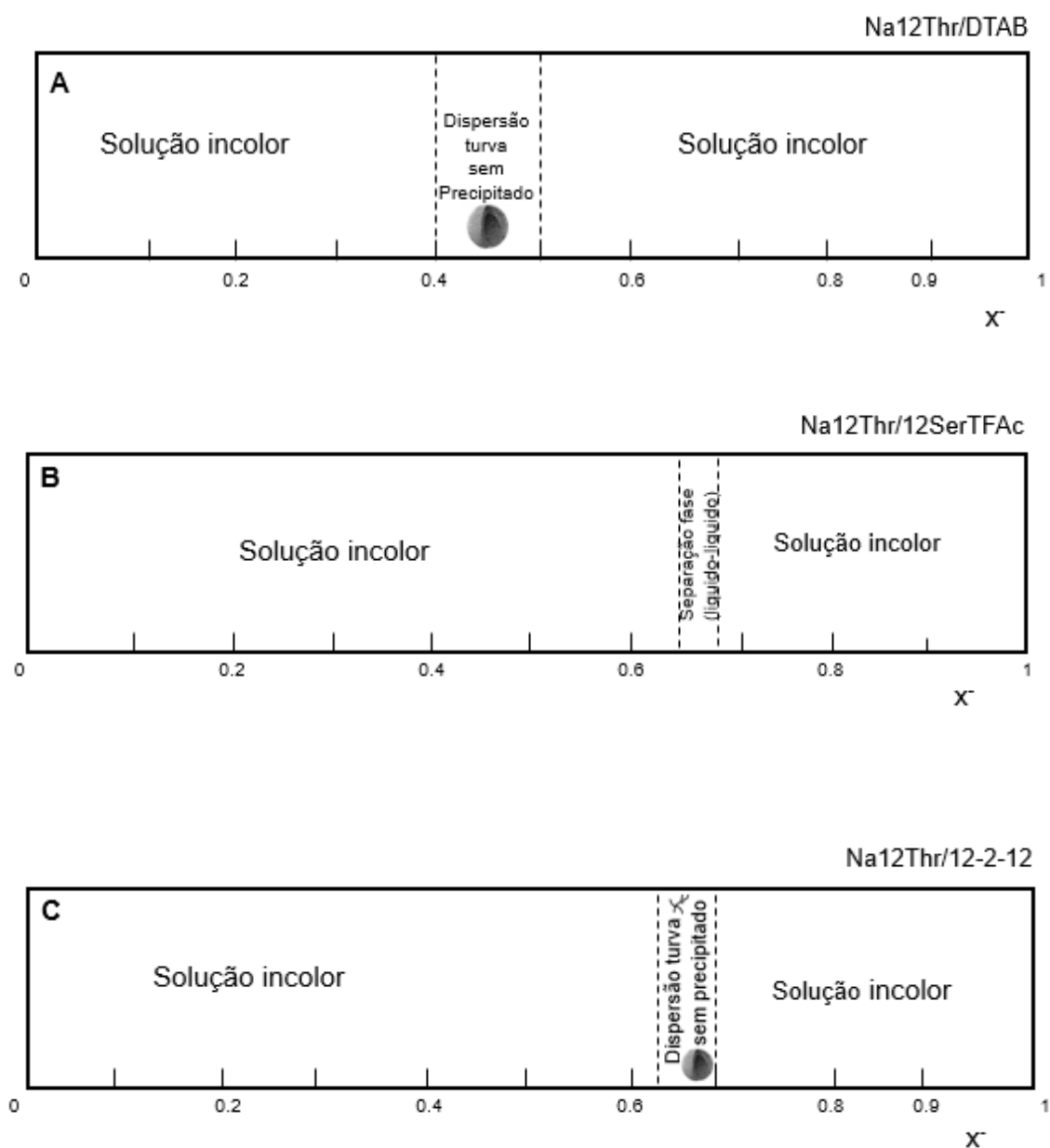
### 3.4. Análise comparativa das misturas catiónicas: efeito da estrutura molecular do tensioativo catiónico

No presente trabalho, foram estudadas as propriedades de auto-agregação e comportamento de fase de misturas catiónicas entre o composto Na12Thr com um conjunto de diferentes tensioativos catiónicos. O tensioativo aniónico usado nas misturas catiónicas foi selecionado tendo por base as suas boas propriedades interfaciais, ser solúvel à temperatura ambiente sem recurso a ajuste de pH e apresentar

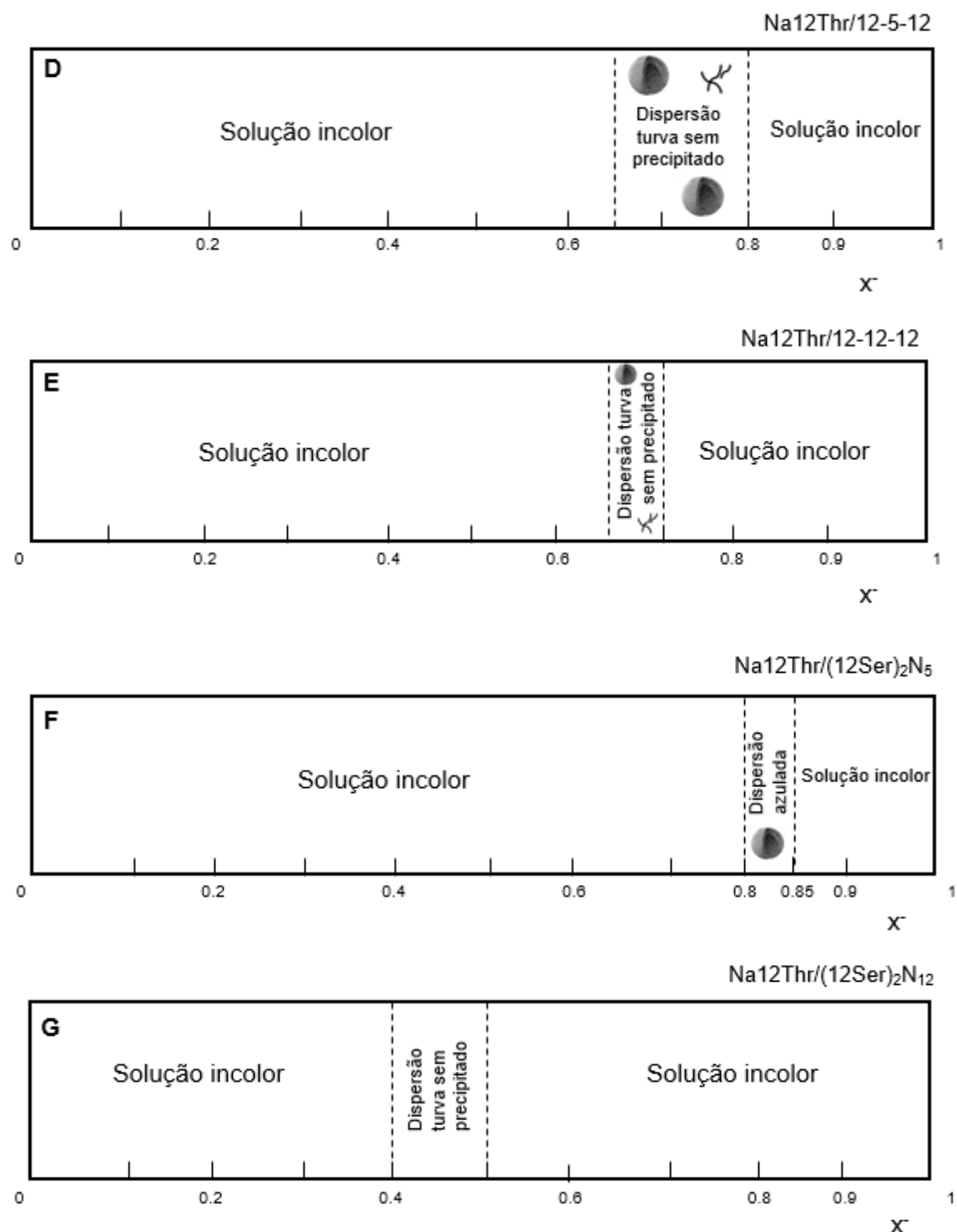
uma cadeia alifática com 12 átomos de carbonos, tal como os tensioativos catiónicos selecionados.

De um modo geral (exceto para o sistema Na12Thr/12-5-12 a 30.0 °C e 35.0 °C), todas as misturas cataniónicas foram estudadas a temperatura ambiente, observando-se amostras turvas e sem precipitado, amostras límpidas com sólido em suspensão e amostras com separação de fase (líquido-líquido).

Na figura 3.35 apresenta-se a representação esquemática do comportamento de fase e microestrutural para as sete misturas cataniónicas estudadas.







**Figura 3.35** – Representação esquemática do comportamento físico dos sistemas cataniônicos estudados. A – Na12Thr/DTAB; B – Na12Thr/12SerTFAC; C – Na12Thr/12-2-12; D – Na12Thr/12-5-12; E – Na12Thr/12-12-12; F – Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e G – Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>.

No que diz respeito aos sistemas Na12Thr/12SerTFAC e Na12Thr/DTAB, verificam-se diferenças a nível macroscópico e microscópico. Para o sistema Na12Thr/12SerTFAC e na região próxima à de equimolaridade de cargas, observa-se

macroscopicamente separação de fase do tipo líquido-líquido, podendo indicar a presença de um líquido iónico. Em contraste, para o sistema Na12Thr/DTAB e para  $x^- = 0.67$ , a solução apresenta-se incolor. Relativamente a este sistema, deve-se realçar o facto das soluções se encontrarem turvas e sem precipitado no lado rico em tensioativo catiónico, detetando-se a presença de agregados multivesiculares para  $x^- = 0.40$ .

Comparando os sistemas, Na12Thr/12-n-12 com espaçador  $n = 2, 5$  e  $12$ , verifica-se que a mistura Na12Thr/12-5-12 apresenta a maior gama de composição com estruturas vesiculares. Na região de equimolaridade de cargas ( $x^- = 0.67$ ), somente a mistura Na12Thr/12-12-12 apresenta uma separação de fase líquido-líquido. Para um excesso de tensioativo aniónico, os três sistemas apresentam uma região, onde estão presentes lipossomas esferóides unilamelares ou oligolamelares.

Na análise dos sistemas Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>, verificam-se diferenças significativas quer a nível macroscópico, quer a nível microscópico. Na região próxima da equimolaridade de cargas, ambos os sistemas apresentam soluções incolores. Para um excesso relativo de tensioativo aniónico, o sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> apresenta uma zona de dispersão azulada, onde para  $x^- = 0.80$ , estão presentes estruturas vesiculares. Por outro lado, para o sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub> as amostras ricas em tensioativo aniónico encontram-se límpidas, não contendo agregados vesiculares. Para este sistema, e embora para um excesso relativo de tensioativo catiónico as amostras se encontrem turvas e sem precipitado, microscopicamente não foram encontradas estruturas vesiculares.

Os sistemas cataniónicos Na12Thr/12-5-12, Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> e Na12Thr/12-12-12, Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub> permitem comparar o efeito de diferentes tensioativos de tipo gemini na agregação.

Para as misturas cataniónicas contendo tensioativos catiónicos com espaçador  $n=5$ , verifica-se macroscopicamente que para excesso de tensioativo aniónico, as soluções se encontravam turvas sem precipitado ou azuladas, sendo visualizados em ambos os casos lipossomas e para Na12Thr/12-5-12 agregados tubulares.

Quanto aos sistemas Na12Thr/12-12-12 e Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>, enquanto que para o sistema com gemini convencional são visualizados agregados vesiculares e tubulares, para o sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>, o mesmo não se verifica, embora macroscopicamente exista uma região com soluções turvas e sem precipitado.

Na literatura encontram-se reportados diversos sistemas cataniónicos, com os quais se podem comparar as misturas estudadas no trabalho realizado. No caso particular da mistura cataniónica Na12Thr/DTAB, é possível fazer-se a comparação com o sistema 12Lys/DTAB<sup>76</sup>. Para ambos os sistemas e na região de excesso catiónico, verifica-se a existência de agregados vesiculares. Na mistura cataniónica 12Lys12/12

Ser<sup>76</sup>, para excesso de derivado de serina, verifica-se a existência de partículas sólidas amorfas e flocos birrefringentes, enquanto que para na região de excesso aniónico se verifica a existência de agregados tubulares e esféricos. O anterior sistema cataniónico pode ser comparado com o sistema cataniónico entre o tensioativo aniónico derivado de treonina e o tensioativo gemini derivado de aminoácido serina, no qual só se verificou a existência de separação de fase na região próxima de equimolaridade.

Em ambos os sistemas SDS/12-*n*-12<sup>77</sup> (com  $n = 6$ ) e o sistema Na12Thr/12-*n*-12, com  $n = 2, 5$  e 12, verifica-se a existência de lipossomas na região rica em tensioativo aniónico.

Depois da análise de resultados, e tendo em conta o objetivo de estudo destes sistemas (deteção de estruturas vesiculares estáveis e sua caracterização morfológica preliminar), verifica-se que o sistema Na12Thr/12-5-12 apresenta uma maior versatilidade e aplicabilidade, tendo em conta que possui, de entre os sistemas investigados, a gama mais extensa de composição onde se verifica a formação de lipossomas.

## IV Conclusão

### 4.1. Conclusões gerais

No presente trabalho, investigou-se o comportamento de auto-agregação e propriedades interfaciais de uma série de novos tensioativos derivados do aminoácido treonina, com comprimento de cadeia alifática variável.

Relativamente às propriedades interfaciais, foram realizados estudos, com e sem pH ajustado, das soluções de tensioativo. Nas medições sem ajuste de pH, verificou-se para dois dos compostos em estudo (Na14Thr e Na16Thr) a presença de um mínimo na tensão superficial. De modo a evitar-se a formação do ácido conjugado destes compostos, responsável pelo mínimo na tensão superficial (devido à sua maior ação interfacial), realizaram-se medições de tensiometria com pH ajustado (alcalino).

O valor da *cmc* dos tensioativos aniónicos demonstrou ser dependente do comprimento da cadeia alquílica, sendo que, com o aumento do número de carbonos, a *cmc* diminui, devido ao aumento de hidrofobicidade do composto. Verificou-se um decréscimo linear do  $\log(\text{cmc})$  em função do número de carbonos da cadeia hidrocarbonada. Comparando os valores de concentração micelar crítica dos tensioativos estudados com os seus análogos convencionais, conclui-se que os tensioativos derivados de treonina apresentavam concentrações micelares críticas significativamente inferiores, o que atesta o seu bom desempenho interfacial.

Relativamente ao comportamento fásico das misturas cataniónicas estudadas, foram visualizadas diferenças, tanto a nível macroscópico como microscópico.

Para a mistura cataniónica Na12Thr/DTAB, e para excesso catiónico de tensioativo, visualizou-se a presença de agregados multivesiculares para a razão de mistura  $x^- = 0.40$ . Quanto ao sistema Na12Thr/12SerTFAc, verificou-se a existência de uma separação de fase do tipo líquido-líquido.

Nos sistemas cataniónicos Na12Thr/12-*n*-12, com espaçador  $n = 2, 5$  e  $12$ , identificaram-se diferentes tipos de estruturas vesiculares, especialmente para um excesso de tensioativo aniónico, sendo que para o excesso de tensioativo catiónico as soluções se encontravam límpidas e sem precipitado, não se visualizando a presença de agregados vesiculares. Embora algumas das amostras cataniónicas entre o derivado de treonina e geminis bis-quats derivados de serina se apresentassem como um líquido turvo ou azulado sem precipitado, só para o sistema Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub> foi verificada a existência de lipossomas. Globalmente, pode afirmar-se que sistemas baseados em derivados de treonina parecem apresentar forte tendência de agregação em estruturas

vesiculares em misturas com tensioativos de carga oposta. Face aos resultados obtidos, e de entre os sistemas investigados, o sistema mais promissor para desenvolvimento e aplicações futuras será o sistema cataniónico Na12Thr/12-5-12.

## 4.2. Trabalho futuro

Por forma a explorar mais aprofundadamente a formação de agregados cataniónicos em solução, e de modo a tentar explicar-se os mecanismos de interação e estruturas intermédias associadas, poderão ser futuramente realizados estudos com recurso à utilização de outras técnicas experimentais de caracterização, tais como DSC, RMN de difusão e *cryo*-TEM.

Para se dar continuidade aos estudos já efetuados para as novas moléculas anfifílicas individuais, e na tentativa de se obter as propriedades interfaciais para as razões de mistura cataniónica (por ex. grau de sinergia e não idealidade) mais aliciantes em termos de aplicabilidade, poder-se-iam realizar estudos de tensão superficial.

A utilização destes agregados cataniónicos formados espontaneamente para veiculação de moléculas-alvo de interesse biológico, é uma área promissora e em franco crescimento, podendo ser assim explorada num futuro próximo. Para tal, o primeiro ponto de partida seria a realização de testes toxicológicos, com o intuito de comprovar a biocompatibilidade dos compostos. Posteriormente, poderiam ser realizados estudos de encapsulação de diferentes moléculas-alvo, como por exemplo, DNA e fármacos.

## V Bibliografia

1. Marques, E. F.; Silva, B. F. B., Surfactant Self-Assembly. In *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*, Springer, Heidelberg, 2013.
2. Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2002.
3. Jokela, P.; Jönsson, B.; Khan, A., *J. Phys. Chem. B* **1987**, *91*, 3291.
4. Khan, A.; Marques, E., Catanionic Surfactants. In *Specialist Surfactants*, Robb, I. D., Ed. Blackie Academic & Professional: London, 1997; p 37.
5. Rosen, M. J.; Tracy, D. J., *J. Surf. Detergents* **1998**, *1*, 547-554.
6. Silva, S. G.; Fernandes, R. F. E.; Marques, E. F.; do Vale, M. L. C., *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 345-352.
7. Prata, C.; Mora, N.; Polidori, A.; Lacombe, J. M.; Pucci, B., *Carbohydr. Res.* **1999**, *321*, 15-23.
8. Huang, J.-B.; Yan, Y.; Li, Z.-C.; Zhao, X.-L.; Zhu, B.-Y.; Ma, J.- M., *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*, 206-210.
9. Wang, Y.; Marques, E. F.; Pereira, C. M., *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 7458-7466.
10. Marques, E. F.; Regev O.; Khan A.; Lindman, B., *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *83-104*, 100-102.
11. Spenley, N.; Cates, M.; McLeish, T., *Phy. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 939-942.
12. Evans, D. F.; Wennerström, H., *The Colloid Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*; Wiley-VCH: New York, 1999.
13. De Gennes, P. G., *In Scaling Concepts in Polymer Physics*. New York, 1979.
14. Grand, C.; Arrault, J.; Cates, M. E., *J.Phys.II* **1997**, *7*, 1071.
15. Turner, M. S.; Cates, M. E., *Langmuir* **1991**, *7*, 1590.
16. Zana, R., *Dynamics of Surfactants Self-Assemblies*. CRC Press: Califórnia, 2005; Vol. 125.
17. Marques, E. F.; Silva, B. F. B., Surfactants, Phase Behaviour. In *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*; Springer, Ed.: Heidelberg, 2013.
18. Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E., *Organic Chemistry: Structure and Function*. 6nd ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 2011.
19. Brito, O. R.; Silva, S. G.; Fernandes, R. M. F.; Marques, E. F.; Rodríguez-Borges, J. E.; do Vale, M. L. C., *Colloids Surf. B- Biointerfaces* **2011**, *86*, 65-70.
20. Silva, S. G.; Rodríguez-Borges, J. E.; Marques, E. F.; do Vale, M. L. C., *Tetrahedron Lett.* **2009**, *65*, 4156-4164.

21. Moran, M. C.; Pinazo, A.; Perez, L.; Clapés, P.; Angelet, M.; Garcia, M. T.; Vinardell, M. P.; Infante, M. R., *Green Chemistry* **2004**, 6, 233.
22. Ghosh, A.; Dey, J., *J. Phys. Chem* **2008**, 112, 6629-6635.
23. Mohanty, A.; Dey, J., *Langmuir* **2007**, 23, 1033-1040.
24. Rosa, M.; Moran, M. C.; Miguel, M. G.; Lindman, B., *Colloids Surf. A* **2007**, 301, 361.
25. Mayers, D., *Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications*. 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 1999.
26. Tanford, C., *The Hydrophobic Effect*. John Wiley & Sons: New York, 1980.
27. Nagarajan, R.; Ruckenstein, E., *Langmuir* **1991**, 7, 2934.
28. Berg, J. C., *An Introduction to Interfaces & Colloids, The Bridge to Nanoscience*. Singapore, 2010.
29. Thomssen, E. G.; Mccutcheon, J. W., *Soaps and Detergents*. New York, 1949.
30. Hamley, I. W., *Introduction to Soft Matter Polymers, Colloids, Amphiphiles and Liquid Crystals*. New York, 2000.
31. Mukherjee, I.; Moulik, S. P.; Rakshit, A. K., *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, 394, 329-36.
32. Antonietti, M.; Forster, S., *J. Adv. Matter* **2003**, 15, 1323-1333.
33. Antunes, F. E.; Brito, O. R.; Marques, E. F.; Lindman, B.; Miguel, M. D., *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 116.
34. Myers, D., *Surfaces, Interfaces and Colloids, Principles and Applications*. 2nd ed.: New York, 1999.
35. Laughlin, R. G., *The Aqueous Phase Behavior of Surfactants*. San Diego, 1994.
36. Marques, E. F.; Regev, O.; Khan, A.; Miguel, M. D.; Lindman, B., *Macromolecules* **1999**, 32, 6626.
37. Gonzales-Perez, A.; Schmutz, M.; Waton, G.; Romero, M. J.; Krafft, M. P., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 756.
38. Bernheim-Groswasser, A.; Zana, R.; Talmon, Y., *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 12192.
39. Almgren, M.; Edwards, K.; Karlsson, G., *Colloids Surf. A* **2000**, 174, 3.
40. Marques, E. F., *Surfactant Vesicles: Formation, Properties, and Stability*. In *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, 2nd ed.; Francis, T., Ed. 2010.
41. Taylor, T. W.; Davidson, P. M.; Bruce, B. D.; Weiss, J., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, 45, 587-605.
42. Dias, R. S.; Lindman, B., *DNA Interactions with Polymers and Surfactants*. New Jersey, 2008.
43. Walde, P.; Ichikawa, S., *Biomol. Eng.* **2001**, 18, 143-177.

44. Andreozzi, P.; Funari, S. S.; La Mesa, C.; Mariani, P.; Ortore, M. G.; Sinibaldi, R.; Spinozzi, F., *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8056-8060.
45. Russo, L.; Berardi, V.; Tardani, F.; La Mesa, C.; Risuleo, G., *BioMed Research International* **2013**.
46. Jiang, Y.; Li, F.; Luan, Y.; Cao, W.; Ji, X.; Zhao, L.; Zhang, L.; Li, Z., *Int. J. Pharm.* **2012**, *436*, 806-814.
47. Bramer, T.; Dew, N.; Edsman, K., *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 1319-1334.
48. Malmsten, M., *Soft. Matter* **2006**, *2*, 760-769.
49. Awasthi, V. D.; Garcia, D.; Klipper, R.; Goins, B. A.; Phillips, W. T., *J. Pharm. Exp. Ther.* **2004**, *309*, 241-8.
50. Uhumwangho, M. U.; Okor, R. S., *J. Biom. Sci.* **2005**, *4*, 9-21.
51. Lavigne, C.; Yelle, J.; Sauvé, G., *AAPS Pharmsci* **2001**, *3*, 1-12.
52. Marques, E. F.; Regev O.; Khan, A.; Miguel, M. D.; Lindman, B., *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6746-6758.
53. Mel'nikov, S. M.; Dias, R.; Mel'nikova, Y. S.; Marques, E. F.; Miguel, M. G.; Lindman, B., *FEBS Letters* **1999**, *453*, 113-118.
54. Stocco, A.; Carriere, D.; Cottat, M.; Langevin, D., *Langmuir* **2010**, *26*, 10663-10669.
55. Rojewska, M.; Olejnik, A.; Rychlik, J.; Prochaska, K., *Colloids Surf. A* **2013**.
56. Šegota, S.; Težak, D., *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *121*, 51-75.
57. Brito, R. O.; Marques, E. F.; Silva, S. G.; do Vale, M. L.; Gomes, P.; Araujo, M. J.; Rodriguez-Borges, J. E.; Infante, M. R.; Garcia, M. T.; Ribosa, I.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M., *Colloids Surf. B-Biointerfaces* **2009**, *72*, 80-87.
58. Wang, Y. J.; Marques, E. F., unpublished results.
59. Alami, E.; Beinert, G.; Marie, P.; R., Z., *Langmuir* **1993**, *9*, 1465-1467.
60. Zana, R.; Benroau, M.; Rueff, R., **1991**, *7*, 1072-1075.
61. Ghosh, P., *Colloid and Interface Science*. PHI Learning: New Delhi, 2009.
62. Rusanov, A. I.; Prokhorov, V. A.: Amsterdam, 1996.
63. Abramowitz M., *Basics and Beyond*. Melville, 2003; Vol. 1.
64. Collings P.J.; Hird M., *Introduction to Liquid Crystals - Chemistry and Physics*. 1<sup>st</sup> ed.; Taylor & Francis: London, 1997.
65. Atkins P.; Paula, J., *Atkins Physical Chemistry*. 7<sup>th</sup> ed.; Oxford University Press: New York, 2002.
66. Issman, L.; Talmon, Y., *J. Microsc.* **2012**, *246*, 60-69.
67. Goodhew, P. J.; Humphreys, J.; Bearland, R., *Electron microscopy and analysis*. London, 2001.
68. Pecora, R., *J. of Nanoparticle Research* **2000**, *2*, 123-131.



69. Calejo, M. T.; Kjøniksen, A.-L.; Marques, E. F.; Araújo, M. J.; Sande, S. A.; Nyström, B., *Eur. Polym. J.* **2012**, *48*, 1622-1631.
70. Oliveira, I. M.; Silva, J. P.; Feitosa, E.; Marques, E. F.; Castanheira, E. M.; Real Oliveira, M. E., *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *374*, 206-17.
71. Marques, E. F.; Brito, O. R.; Silva, S. G.; Rodríguez-Borges, E.; Do Vale, M. L.; Gomes, P.; Araujo, M. J.; Söderman, O., *Langmuir* **2008**, *24*, 11009-11017.
72. Xu, K.; Wang, L.; Xing, F., *J.Surfact.Deterg.* **2011**, *14*, 85-90.
73. Brito, O. R.; Oliveira, I. S.; Araujo, M. J.; Marques, E. F., *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *9*-52.
74. Brito, O. R.; Marques, E. F.; Gomes, P.; Falcão, S.; Söderman, O., *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18158.
75. Boettcher, C.; Schade, B.; Fuhrhop, J. H., *Langmuir* **2001**, *17*, 873.
76. R. O. Brito, E. F. M., S. G. Silva, M. L. Vale, P. Gomes, M. J. Araújo, J. E. Rodríguez-Borges, M. R. Infante, M. T. Garcia, I. Ribosa, M. P. Vinardell, M. Mitjans, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2009**, *72*, 80-87.
77. Wang, Y.; Bai, G.; Marques, E. F.; Yan, Y., *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5924-5300.

## Anexo I - Tabelas

**Tabela 1.** Composição e comportamento físico e estrutural das misturas cataniônicas Na12Thr/DTAB

Mistura	Amostras	$x^-$	$x^+$	Observações
12Thr/DTAB 5mM	1	0.10	0.90	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	2	0.20	0.80	
	3	0.30	0.70	
	4	0.37	0.63	
	5	0.40	0.60	Dispersão turva e sem precipitado; lipossomas
	6	0.50	0.50	Dispersão turva e sem precipitado; sem lipossomas visíveis
	7	0.60	0.40	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	8	0.70	0.30	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	9	0.80	0.20	
	10	0.90	0.10	

**Tabela 2.** Composição e comportamento físico e estrutural das misturas cataniônicas Na12Thr/12SerTFAC

Mistura	Amostras	$x^-$	$x^+$	Observações
12Thr/12SerTFAC 10mM	1	0.10	0.90	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	2	0.20	0.80	
	3	0.30	0.70	
	4	0.40	0.60	
	5	0.50	0.50	
	6	0.60	0.40	
	7	0.67	0.33	Separação de fase (líq:líq)
	8	0.70	0.30	Solução límpida; sem lipossomas visíveis
	9	0.80	0.20	Solução límpida; sem lipossomas visíveis
	10	0.90	0.10	

**Tabela 3.** Composição e comportamento físico e estrutural das misturas cataniônicas Na12Thr/12-2-12

Mistura	Amostras	$x^-$	$x^+$	Observações
12Thr/12-2-12 5mM	1	0.10	0.90	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	2	0.20	0.80	
	3	0.30	0.70	
	4	0.40	0.60	
	5	0.50	0.50	
	6	0.60	0.40	
	7	0.67	0.33	Dispersão turva e sem precipitado; lipossomas e agregados tubulares
	8	0.70	0.30	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	9	0.73	0.27	
	10	0.80	0.20	
	11	0.90	0.10	

**Tabela 4.** Composição e comportamento físico e estrutural das misturas cataniônicas Na12Thr/12-5-12

Mistura	Amostras	$x^-$	$x^+$	Observações
12Thr/12-5-12  5mM	1	0.10	0.90	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	2	0.20	0.80	
	3	0.30	0.70	
	4	0.40	0.60	
	5	0.50	0.50	
	6	0.60	0.40	
	7	0.65	0.35	Dispersões turvas e sem precipitado; lipossomas e agregados tubulares
	8	0.67	0.33	
	9	0.70	0.30	
	10	0.73	0.27	
	11	0.75	0.25	
	12	0.80	0.20	
	13	0.90	0.10	Solução límpida; sem lipossomas visíveis

**Tabela 5.** Composição e comportamento físico e estrutural das misturas cataniônicas Na12Thr/12-12-12

Mistura	Amostras	$x^-$	$x^+$	Observações
12Thr/12-12-12  5mM	1	0.10	0.90	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	2	0.20	0.80	
	3	0.30	0.70	
	4	0.40	0.60	
	5	0.50	0.50	
	6	0.60	0.40	
	7	0.67	0.33	Dispersão turva e sem precipitado; separação de fase (liq:liq)
	8	0.69	0.31	Solução límpida; sem lipossomas visíveis
	9	0.70	0.30	Dispersão turva e sem precipitado; lipossomas e agregados tubulares
	10	0.73	0.27	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	11	0.80	0.20	
	12	0.90	0.10	

**Tabela 6.** Composição e comportamento físico e estrutural das misturas cataniônicas Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>5</sub>

Mistura	Amostras	x <sup>-</sup>	x <sup>+</sup>	Observações
12Thr/(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>5</sub> 5mM	1	0.10	0.90	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	2	0.20	0.80	
	3	0.30	0.70	
	4	0.40	0.60	
	5	0.50	0.50	
	6	0.60	0.40	
	7	0.70	0.30	
	8	0.75	0.25	
	9	0.80	0.20	Dispersão azulada; lipossomas
	10	0.85	0.15	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	11	0.90	0.10	

**Tabela 7.** Composição e comportamento físico e estrutural das misturas cataniônicas Na12Thr/(12Ser)<sub>2</sub>N<sub>12</sub>

Mistura	Amostras	x <sup>-</sup>	x <sup>+</sup>	Observações
12Thr/(12Ser) <sub>2</sub> N <sub>12</sub> 5mM	1	0.10	0.90	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	2	0.20	0.80	
	3	0.30	0.70	
	4	0.40	0.60	Dispersão turva e sem precipitado; sem lipossomas visíveis
	5	0.50	0.50	
	6	0.60	0.40	Soluções límpidas; sem lipossomas visíveis
	7	0.70	0.30	
	8	0.80	0.20	
	9	0.90	0.10	